

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

**Implicación de la isoforma H del factor de  
transcripción asociado a microftalmia (MITF-H) en  
la Transición Epitelio-Mesénquima inducida por los  
factores de las familias Snail y bHLH**

SONIA VILLA VICIOSA

Madrid, 2007



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Implicación de la isoforma H del factor de  
transcripción asociado a microftalmia (MITF-H) en  
la Transición Epitelio-Mesénquima inducida por los  
factores de las familias Snail y bHLH**

Memoria que presenta para optar al Título de  
Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid  
la Licenciada en Bioquímica

**Sonia Villa Viciosa**

Directora de tesis: **Dra. Amparo Cano García**  
Catedrática del Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Investigaciones  
Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) gracias a  
una beca FPI del Ministerio de Educación y Ciencia

Madrid, 2007





Amparo Cano García,

Catedrática del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA que:

Sonia Villa Viciosa, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina - Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) de Madrid, el trabajo titulado “Implicación de la isoforma H del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF-H) en la Transición Epitelio-Mesénquima inducida por los factores de las familias Snail y bHLH”.

El presente trabajo cumple, a mi juicio, con los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, 30 de Agosto de 2007

Fdo. Dra. Amparo Cano García



*A mi familia*

*A Emilio*



## ***AGRADECIMIENTOS***



*“La felicidad es darse cuenta de  
que nada es demasiado importante”*

*(Antonio Gala)*

Al fin llegó..., cuando empiezas la tesis parece que no va a llegar este momento, lo ves como algo lejano, algo para lo que queda mucho tiempo..., pero llega y más rápido de lo que te imaginas y entonces es el momento de mirar atrás y de ponerte a recordar todos los momentos buenos que has vivido y a toda la gente que te ha acompañado en ellos. Y es que parte de esta tesis, es gracias a todos vosotros, que de una forma u otra me habéis acompañado durante esta etapa de mi vida que ahora termina.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a Amparo. Sin duda, esta tesis ha sido posible gracias a ella. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en tu laboratorio, por tu confianza en mí, por tus consejos, por tu interés en esta tesis y por sacar tiempo de donde no lo hay para que este proyecto saliese adelante. Gracias a Paco Portillo, con tu buen humor y tus magníficos consejos e ideas haces que las cosas parezcan menos difíciles. A Miguel Quintanilla, por tus comentarios y por tus críticas, siempre constructivas. A M<sup>a</sup> Jesús Mazón, a Pilar Eraso y a Jaime Renart por vuestra acogida cuando el techo cayó sobre nuestras cabezas. Gracias por dejarnos un hueco en vuestros laboratorios y por hacernos sentir como en el nuestro.

Gracias a todos los niños del 1.13 y como no del 1.12!!! y es que aunque en las puertas de los laboratorios ponga 1.12 ó 1.13, siempre hemos sido como un único laboratorio.

La verdad que no sé por donde empezar, sois todos maravillosos. Durante mucho tiempo fui la “peque” del grupo y desde el primer día me acogisteis como uno más. Gracias por aguantar todos mis agobios y miedos durante todo este tiempo. Sin vosotros, esto no hubiera sido lo mismo. Gracias a Mamen, por todo el tiempo que me dedicaste en mis principios y por todos tus consejos dentro del mundo del RNA. A Amalia y Vanesa, siempre dispuestas a echar una mano. Muchas gracias a las dos, ya que mucho del trabajo del laboratorio no sería posible sin vuestra magnífica ayuda. Gracias a Gema y Marta (“Dolores y Minidolores”), las dos últimas incorporaciones del 1.13 y vaya incorporaciones “lo mejorcito del CNIO”. Gracias por vuestro apoyo durante estos últimos meses, a Marta por preocuparte de mí y no dejarme adelgazar ni un gramo más..., ¡¡¡tienes razón!!! y a ti Gema, por tus buenos consejos, por tu cariño y por tratarme como una amiga desde el principio. A Matthew, nuestro escocés del 1.13. Gracias por tu forma de ver la vida tan particular, por ser tan majo y como no, siempre tan educado!!!. A Patri, la niña “Zen” del 1.13. Gracias por tu serenidad y amabilidad, por echarme una mano siempre que lo he necesitado y por compartir esa filosofía de vida tan especial con nosotros. Gracias a Vero, por ser tan buena persona, por tu cariño y paciencia (esto está “chupao”, así que ya sabes adelante!!!). A David, por preocuparte de mí, por ayudarme en todo lo que he necesitado y por todo lo que he aprendido a tu lado.

A Miri “cabecita loca”, gracias por tus consejos y ayuda, por ser tan buena persona y una gran amiga. Ya sabes que aunque estás un poco lejos y no nos vengas a ver a menudo, no te olvidamos. A Héctor, el “niño melón”, gracias por ser una persona tan especial, de las que son difíciles de encontrar, siempre dispuesto a ayudar, tan optimista, inteligente, guapetón... (se nota que somos casi familia, eh?), no me extraña que todo te vaya fenomenal, te lo mereces. Y como no a Marta, sin duda, una de las culpables de que yo terminase en el 1.13. Sois una pareja excepcional, os deseo toda la felicidad del mundo para esta etapa nueva que comenzáis juntos y ya sabéis, guardarme una camita en Nueva York, algo pequeño que yo quepo en cualquier parte. Por último quiero darte las gracias a ti, Eva, nuestra “Pelona”, por ser tan buena amiga durante todo este tiempo, por quererme tanto y por tu ayuda dentro y fuera del trabajo. Gracias por estar ahí en todo momento y por tus consejos a la hora de tomar decisiones importantes.

Y ahora toca al 1.12!!!. Gracias a Jesús, la última “adquisición” de 1.12, con tu buen humor ya te has hecho uno más del laboratorio. Gracias a Bea, más conocida como MiniPi, ¡vaya salero tiene la cordobesa! A M<sup>a</sup> Marta “Churrita”, gracias por tu ayuda y por estar siempre tan pendiente de mí, en lo bueno y en lo malo. Mucho ánimo, ya verás que con un poco de optimismo y tesón saldrás adelante, hazme caso. A Edurrrr, gracias por ser tan majo y cariñoso y por todos los buenos momentos que nos has hecho pasar. Y también para María, nuestro enlace con la UAM, gracias. A Ester, nuestro “pikachu” del 1.12, la verdad es que sin ti, las fiestas no hubieran sido lo mismo, jejejeje, gracias por todos esos momentos tan divertidos que hemos pasado juntas y que nunca voy a olvidar. Os deseo a ti y a David lo mejor en vuestra nueva etapa por Londres, ¡¡¡pedazo de científicos que se llevan los ingleses!!!, no se quejarán... guardarme una camita que de una visita mía no os vais a librar. A Mar, “Ponch”, la niña más elegante y con mejor gusto de todo el IIB (por qué será???), gracias por tu amistad y cariño y por transmitirme esa fuerza de voluntad que te hace siempre ser tan positiva.

Como no, me gustaría agradecer a la gente de otros laboratorios el buen ambiente que hemos disfrutado por los pasillos del IIB durante todos estos años. Gracias a Quilla, Carol, Jacinto, David, Tere, Ana, Maicha, Jorge, Jinny, Marina, Jorge, Merche, Sita, Chus, Paloma, Jimena, Pablo, Lara, María... y un sinfín de gente más con la que he tenido la suerte de trabajar durante este tiempo.

Gracias también a la gente de los servicios comunes del IIB, Jose, Ricardo, Antonio, Merino, Guti...gracias a todos por vuestra ayuda. Y como no, a Brenda, mi profe de Inglés. Gracias por tus consejos académicos y no académicos y por ser tan buena profesora y como no, amiga.

A mis amigas de siempre, Camino, Cris, Almu, Miri, Arancha, Oli, M<sup>a</sup>Jo, Gema, Sara M. y Sara N. y como no a todos los respectivos: Ricardo, Carlos, M.Ángel, Rorro, Martín, Miguel, Fernando, Antonio..., somos ya un montón!!! Gracias por estar siempre ahí, por nuestra amistad, por todos los momentos vividos juntos y por todos los que viviremos en el futuro. Gracias a todos, sois los mejores!!!



Y por fin toca a los que más se lo merecen: MI FAMILIA!!! muchísimas gracias, porque sin vosotros esto seguro que no hubiera salido adelante. Gracias a todos por vuestros consejos y ayuda, por quererme tal y como soy y sobre todo, por confiar en mí. Gracias muy especialmente a mi madre, quien más ha “sufrido” conmigo todos mis miedos, agobios y nervios durante estos años. Gracias mami, por cuidarme tanto, por apoyarme siempre y sobre todo por hacer que saliese adelante. A mi “familia política”, a la que ya considero mi familia. Gracias por vuestro cariño, vuestro ánimo, y por hacerme sentir como en casa en todo momento.

Y por último, gracias a ti Emilio, mi “cosita”. La verdad que no tengo palabras para expresar todo lo que te quiero y para agradecerte todo lo que haces por mí día a día. Sin duda, eres la persona más importante de mi vida y sin la cual no hubiera tenido suficientes fuerzas para seguir adelante en los momentos difíciles. Sólo tú y yo sabemos lo difíciles que han sido estos meses. Gracias a ti y a tu fortaleza hemos salido adelante y hemos podido compaginar nuestra vida laboral y personal a la vez que sacábamos una casa adelante. Ahora ya sólo nos queda disfrutar!!! Te quiero.

#### **GRACIAS A TODOS**

*“Cuales quiera que hayan sido nuestros logros,  
alguien nos ayudó siempre a alcanzarlos”  
(Paulo Coelho).*



*RESUMEN*



La transición epitelio-mesénquima (TEM), constituye unos de los eventos más importantes durante la invasión tumoral. La pérdida de adhesión celular, la reorganización del citoesqueleto y la adquisición de propiedades migratorias son eventos celulares clave en este proceso. La pérdida de expresión de cadherina-E constituye uno de los mecanismos determinantes de la TEM. En los últimos años, se han caracterizado varios factores, entre ellos, Snail, Slug y E47, implicados en la represión transcripcional del gen de la *cadherina-E* y en la inducción de TEM que tiene lugar asociada a la adquisición del fenotipo invasivo en células MDCK y otros sistemas. Estudios previos del patrón de expresión génica diferencial han permitido identificar un número de genes cuya expresión está alterada en células MDCK que expresan establemente los factores Snail, Slug o E47. Dentro de éstos, el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), se encontró fuertemente reprimido de forma común por los tres factores, por lo que nos planteamos el estudio de su implicación en la regulación de la expresión de cadherina-E y en el proceso de TEM.

MITF es un gen que codifica para el factor de transcripción de la familia bHLH clase III, implicado en desarrollo embrionario y esencial para la regulación del linaje celular. Existen nueve isoformas de MITF, las cuales comparten los dominios bHLH-LZ y de transactivación, pero difieren en el extremo aminoterminal que confiere distintas propiedades a cada isoforma.

De todas las isoformas analizadas, sólo la expresión de la isoforma MITF-H se encontró reprimida en las tres líneas celulares, MDCK-Snail, -Slug y -E47 y en determinadas líneas tumorales humanas. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la expresión transitoria de los tres factores en células MDCK sugieren, que únicamente el factor E47 y otro miembro de la familia bHLH (E2-2A) actúan directamente sobre el promotor de MITF-H, habiendo demostrado la interacción *in vivo* de E47 a una de las cajas E del promotor de MITF-H humano.

El estudio de la acción de MITF-H sobre el promotor humano de cadherina-E, confirmó la acción positiva de MITF-H en la regulación transcripcional de cadherina-E y el requerimiento de la caja E3 del promotor proximal, tanto en el modelo celular MDCK como en células humanas de carcinoma de mama (MDA-MB435) y de melanoma (A375P). Significativamente, MITF-H es capaz de regular negativamente la expresión de los factores Snail y E47, sugiriendo mecanismos de regulación *feed-back* negativos entre los factores Snail, E47 y MITF-H. Los estudios de ganancia de función de MITF-H en células MDCK-E47 y MDA-MB435 mostraron que la expresión estable de MITF-H en ambos sistemas originó una reversión parcial de la TEM, con re-expresión de cadherina-E, junto con la regulación negativa de Snail y E47 y la pérdida de marcadores mesenquimáticos. En conjunto, estos resultados sugieren que MITF-H actúa como un activador de cadherina-E y como modulador negativo del proceso de TEM.



## *ABSTRACT*





Epithelial-mesenchymal transition (EMT) constitutes one of the most important events during tumor progression in carcinomas. Loss of cell adhesion, rearrangement of the cytoskeleton and acquisition of migratory properties are key cellular events in this process. Loss of E-cadherin expression is presently considered as one of the hallmarks of EMT. In the last years, several transcription factors, among them Snail, Slug and E47, have been described as transcriptional repressors of *E-cadherin* and in induction of EMT associated to the acquisition of the invasive phenotype in MDCK cells and other cell systems. Gene expression profiling studies, has allowed to identify many genes whose expression is altered in MDCK cells stably expressing Snail, Slug or E47 factors. Among them, the microphthalmia associated transcription factor (MITF), was found strongly downregulated in MDCK expressing either of the three factors. These previous observations prompted the study of the implication of MITF in the regulation of E-cadherin and EMT.

MITF is a gene member of the class III bHLH-Zip family of transcription factors. Moreover, MITF plays a central role in embryony development and is essential in growth and survival of several cell lines. At present, nine MITF isoforms have been identified; all of them share the bHLH and transactivation domains, but differ in the N-terminal sequence which confers specific properties to each isoform.

Of the different analyzed isoforms, only the MITF-H isoform was found to be downregulated in MDCK-Snail, -Slug and -E47 cells and in some human cancer cells. However, results obtained in MDCK cells transiently expressing Snail, Slug or E47 factors indicated that only E47 and another bHLH factor (E2-2A) can directly repress the MITF-H promoter. Additionally, we could demonstrate the *in vivo* interaction between E47 factor and one of the E-boxes in the human MITF-H promoter.

The study of action of the MITF-H action on the human E-cadherin promoter, confirmed the positive regulation of MITF-H on the transcriptional regulation of E-cadherin and the requirement of the proximal E-box 3 of the promoter in both MDCK cellular model and human breast cancer (MDA-MB435) and melanoma cells (A375P). Significantly, MITF-H downregulates the expression of Snail and E47 factors, suggesting the existence of negative feedback regulatory mechanisms among Snail, E47 and MITF-H. Gain of function studies of MITF-H in MDCK-E47 and MDA-MB435 cells showed that stable expression of MITF-H in both cell systems led to a partial reversion of EMT, with reexpression of E-cadherin, together with the down regulation of Snail and E47, and the loss of mesenchymal markers. All together, these results support that MITF-H acts as an activator of E-cadherin expression and as a negative modulator of EMT.



## *ÍNDICE*



<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1. Transición epitelio-mesénquima e implicación en la progresión tumoral .....	7
2. Descripción de las cadherinas y su importancia biológica.....	9
2.1. Complejos de unión cadherina-E-cateninas .....	9
2.2. Cadherina-E durante la progresión tumoral .....	10
3. Factores de transcripción implicados en la pérdida de expresión de <i>CDHI</i> e inductores de TEM.....	11
3.1. Factores de la superfamilia Snail: Snail y Slug.....	12
3.2. Factores de la familia ZEB.....	13
3.3. Factores de la familia bHLH: E47, E22A/B y Twist .....	14
4. El factor de transcripción asociado a microftalmia .....	15
4.1. Regulación transcripcional de MITF.....	17
4.1.1. Control de la transcripción mediante promotores alternativos.....	17
4.1.2. Factores reguladores de la transcripción de MITF .....	19
4.2. Regulación postranscripcional .....	20
4.2.1. Fosforilación.....	20
4.2.2. Sumoilación.....	21
4.3. Principales procesos celulares en los que se halla implicado MITF .....	21
4.3.1. Papel dual de MITF sobre el ciclo celular.....	22
4.3.2. Apoptosis.....	24
4.4. Síndromes asociados a las mutaciones en MITF .....	24
4.5. MITF durante la progresión tumoral. Implicación de MITF-M en melanoma .....	25
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
1. Construcciones de DNA.....	33
1.1. Vectores de expresión .....	33
1.2. Plásmidos reporteros .....	33
2. Líneas celulares .....	34
3. Anticuerpos .....	34
4. Cultivos celulares .....	37

5. Transfecciones transitorias y estables de líneas celulares .....	37
5.1. Transfecciones transitorias .....	37
5.2. Transfecciones estables .....	37
6. Ensayos de actividad promotora .....	38
7. Análisis de mRNA .....	38
7.1. Extracción de RNA total .....	38
7.2. Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa .....	38
8. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....	40
9. Análisis de proteínas .....	40
9.1. Inmunotransferencia (Western Blot) .....	40
10. Análisis de inmunofluorescencia .....	41
11. Análisis del perfil de expresión génica asociado a la expresión de Snail, Slug y E47 en las células MDCK .....	42
12. Ensayos de proliferación celular .....	42
13. Ensayos de tumorigenicidad .....	43
14. Inmunohistoquímica .....	43
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
1. Caracterización de la expresión del factor MITF .....	47
1.1. Expresión diferencial de MITF en el modelo MDCK .....	48
1.2. Análisis de la isoforma de MITF expresada en MDCK .....	48
1.3. Análisis de la expresión de MITF-H en líneas tumorales humanas .....	49
2. Análisis del promotor de MITF-H .....	51
2.1. Efecto de la expresión de los factores Snail, Slug y E47 en la actividad del promotor de MITF-H .....	51
2.1.1. Efecto de mutaciones en las cajas E distales del promotor de MITF-H .....	53
2.1.2. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) .....	53
2.2. Estudio del promotor de MITF-H en distintas líneas tumorales humanas .....	55
3. Efecto del factor MITF-H sobre el promotor de <i>CDH1</i> humano .....	56
3.1. Estudio del promotor de <i>CDH1</i> en el sistema MDCK .....	56
3.2. Estudio del promotor de <i>CDH1</i> en líneas tumorales humanas .....	58
4. Regulación de los factores Snail y E47 por MITF-H .....	60
4.1. Efecto de MITF-H sobre los promotores de Snail y E2A .....	61
5. Ganancia de función de MITF-H en el modelo MDCK .....	61

5.1. Caracterización celular/fenotípica de los clones MDCK-E47-EGFP-MITFH .....	62
5.2. Actividad del promotor de <i>CDH1</i> tras la expresión estable de MITF-H en células MDCK-E47.....	64
5.3. Efecto de MITF-H sobre la expresión de los factores Snail y E47 en células MDCK-E47.....	65
6. Transfección estable de MITF-H en células MDA-MB435.....	67
6.1. Caracterización celular/fenotípica de los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH .....	67
6.2. Caracterización de la expresión del factor Snail en células MDA-MB435-EGFP-MITFH .....	69
6.2.1. Control transcripcional del factor Snail en los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH .....	70
6.3. Estudio in vivo de las células MDA-MB435-EGFP-MITFH .....	72
6.3.1. Análisis de la proliferación celular en MDA-MB435-EGFP-MITFH .....	72
6.3.2. Ensayos de tumorigenicidad.....	73
6.3.2.1. Análisis de los tumores generados .....	74
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
1. Regulación de MITF en distintos modelos celulares .....	79
1.1. Caracterización de MITF-H .....	79
1.2. Regulación del promotor de MITF-H .....	80
2. Implicación de MITF-H en el proceso de activación de cadherina-E.....	83
3. Regulación de los factores Snail, Slug y E47 en presencia de MITF-H.....	85
4. Papel de MITF-H durante la TEM y su relación con los factores Snail, Slug y E47.....	87
5. Estudios in vivo del papel de MITF-H durante la progresión tumoral .....	89
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>111</b>





## *ABREVIATURAS*



<b>AMPc:</b>	adenosín monofosfato cíclico
<b>AP2:</b>	proteína activadora 2
<b>bHLH:</b>	domino básico hélice-lazo-hélice
<b>BSA:</b>	seroalbúmina bovina
<b>CBP:</b>	proteína de unión a CREB
<b>CBS:</b>	secuencia de unión a cateninas
<b>CDH1:</b>	gen que codifica para cadherina- E
<b>CDK2:</b>	quinasa dependiente de ciclina 2
<b>ChIP:</b>	ensayo de inmunoprecipitación de cromatina
<b>CMV:</b>	citomegalovirus
<b>CREB:</b>	proteína de unión al DNA en respuesta a AMPc
<b>CtBP:</b>	proteína de unión al extremo carboxilo terminal
<b>DA:</b>	dominio de transactivación
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
<b>DCT:</b>	dopacromo tautomerasa
<b>DEPC:</b>	dietil pirocarbonato
<b>DMEM:</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>E2A:</b>	gen que codifica para E12/E47
<b>EC:</b>	ectodominios
<b>EDNRB:</b>	receptor de la endotelina 3
<b>EDTA:</b>	ácido etilen diamino tetracético
<b>EGFP:</b>	proteína verde fluorescente potenciada
<b>ERK:</b>	quinasa regulada por señales extracelulares
<b>GAPDH:</b>	gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
<b>Gfi-1:</b>	factor de independencia del crecimiento 1
<b>GSK3β:</b>	glucógeno sintasa quinasa 3β
<b>HDACs:</b>	histonas deacetilasas
<b>HEK:</b>	células humanas embrionarias de riñón
<b>HGF:</b>	factor de crecimiento de hepatocitos
<b>HIF1α:</b>	factor inducible por hipoxia 1α
<b>HIT:</b>	proteína de la triada de histidinas
<b>HRP:</b>	peroxidasa del rábano
<b>LEF:</b>	factor potenciador de leucocitos
<b>LIF:</b>	factor inhibidor de leucemia
<b>LZ:</b>	motivo cremallera de leucinas
<b>MAPK:</b>	proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MC1R:</b>	receptor de melanocortina-1
<b>MDCK:</b>	células derivadas de “ <i>Madin Darby Canine Kidney</i> ”
<b>MEC:</b>	matriz extracelular
<b>MiT:</b>	familia de proteínas MITF/TFE
<b>MPCD:</b>	dominio conservado próximo a la membrana
<b>MPED:</b>	dominio extracelular adicional próximo a la membrana
<b>MITF:</b>	factor de transcripción asociado a microftalmia
<b>α-MSH:</b>	gen que codifica para la hormona estimuladora de melanocitos
<b>MC1R:</b>	receptor de melanocortina-1
<b>ONECUT:</b>	gen que codifica para <i>ONECUT</i>
<b>ORF:</b>	<i>open reading frame</i> (marco abierto de lectura)
<b>PAX3:</b>	gen que codifica para la proteína <i>paired homeo box-3</i>
<b>PBS:</b>	tampón fosfato salino
<b>PIAS3:</b>	proteína inhibidora de la activación de STAT3
<b>PI3K:</b>	fosfatidilinositol 3 quinasa
<b>PKA:</b>	proteína quinasa A
<b>PKCι:</b>	proteína quinasa C1

<b>PMSF:</b>	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PMEL17:</b>	gen que codifica para la proteína de matriz del melanosoma 17
<b>Rb1:</b>	proteína del retinoblastoma 1
<b>RPE:</b>	células del epitelio de la retina pigmentada
<b>RSK1:</b>	quinasa ribosomal 1
<b>RT-PCR:</b>	transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
<b>SDS:</b>	dodecil sulfato sódico
<b>SDS-PAGE:</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>Sl:</b>	<i>steel factor</i> (factor de acero)
<b>SMAD:</b>	proteína similar a mad
<b>SNAG:</b>	dominio común a <b>Snail</b> y <b>Gfi-1</b>
<b>SOX10:</b>	gen que codifica para el factor de transcripción <i>SRY-related HMG box10</i>
<b>SP1:</b>	proteína específica 1
<b>SRY:</b>	gen que codifica para la proteína <i>sex-determining region Y</i>
<b>SUMO:</b>	proteína <i>small ubiquitin-like modifier</i>
<b>STAT3:</b>	proteína activadora de la transcripción y traducción de señales
<b>TBS:</b>	tampón tris salino
<b>Tbx2:</b>	gen que codifica para la proteína <i>T-box 2</i>
<b>TCF:</b>	factor de células T
<b>TEM:</b>	transición epitelio-mesénquima
<b>TFE:</b>	gen que codifica para el factor de transcripción “TFE”
<b>TGFβ:</b>	factor de crecimiento transformante beta
<b>TME:</b>	transición mesénquima-epitelio
<b>TRPM1:</b>	receptor transitorio de canal de cationes M1
<b>TYR:</b>	gen que codifica para la enzima tirosinasa
<b>TYRP1:</b>	gen que codifica para la proteína 1 relacionada con la enzima tirosinasa
<b>USF2:</b>	<i>upstream stimulatory factor 2</i> (factor de transcripción “upstream”)
<b>Wnt:</b>	proteína homóloga a la proteína “wingless” de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>WS:</b>	síndrome de Waardenburg
<b>ZEB o SIP1:</b>	proteína de interacción con SMAD

## *INTRODUCCIÓN*



## 1. Transición epitelio-mesénquima e implicación en la progresión tumoral

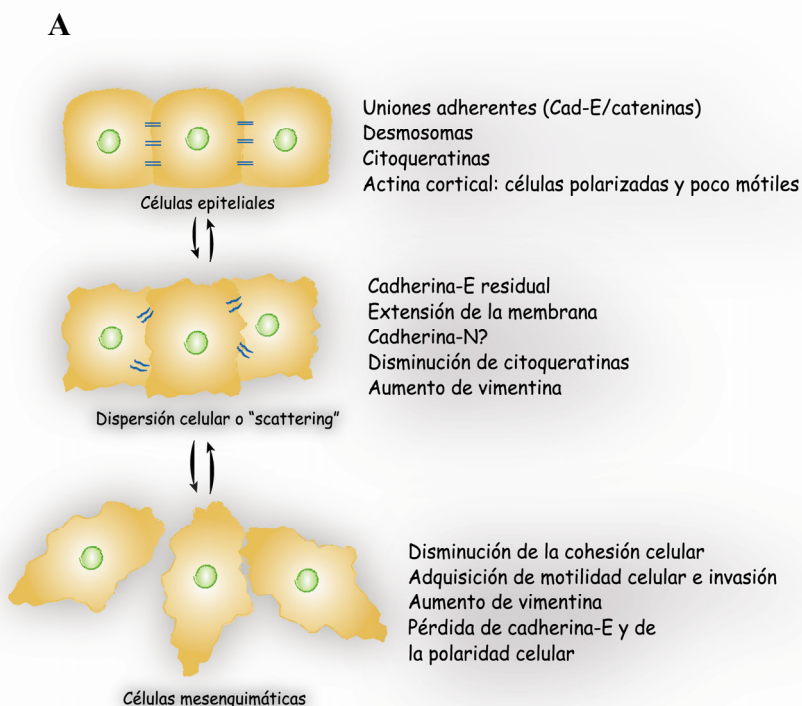
El proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM) fue descrito por primera vez por Greenburg y Hay a principios de los años 80 (Greenburg and Hay, 1982). Durante este evento, las células, con características epiteliales, adquieren características mesenquimales, perdiendo la cohesión intercelular y su anclaje a la matriz extracelular. A nivel celular, la TEM se desarrolla en dos fases distintas: disminución en la adhesión intercelular e incremento en la motilidad celular. Estos pasos, están siempre asociados con la pérdida de la polaridad apico-basal de las células epiteliales. (Gotzmann et al., 2004; Thiery, 2002; Thiery and Sleeman, 2006). Así, en los estadios iniciales de la TEM, las interacciones célula-célula mediadas por diversos complejos proteicos, incluyendo uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones tipo “gap”, son remodeladas y funcionalmente disociadas (Boyer et al., 2000; Savagner, 2001). La reorganización de las uniones adherentes, incluye la ruptura del complejo proteico de adhesión estable (cadherinas/cateninas), seguido por la represión o pérdida completa de cadherina- E (*CDH1*) (Fig. 1A). Durante la TEM, también se experimenta una reorganización del citoesqueleto, las células pierden la polaridad apico-basal, y cambian a un fenotipo más alargado, fibroblastoide y migratorio, expresando marcadores mesenquimáticos y adoptando mecanismos necesarios para invadir la matriz extracelular (MEC) (Boyer et al., 2000; Thiery, 2002; Thiery and Sleeman, 2006). La TEM, es un proceso fundamental en el desarrollo temprano de los vertebrados. Durante la embriogénesis, y tras un proceso de TEM, las células de la cresta neural migrarán desde el tubo neural a distintos entornos, para posteriormente diferenciarse a distintos tipos celulares como células óseas, células del músculo liso, neuronas o melanocitos (Huang and Saint-Jeannet, 2004).

Por otra parte, la TEM también ocurre durante la progresión tumoral, siendo uno de los acontecimientos más importante durante la invasión tumoral, en donde las células tumorales escapan del tumor primario para iniciar la cascada metastática (Lee et al., 2006; Thiery, 2002; Thiery and Sleeman, 2006). Una de las evidencias que se tiene para involucrar al proceso de TEM en tumorogénesis, es la capacidad de determinados reguladores de TEM, para favorecer la progresión del tumor y que éste sea capaz de metastatizar.

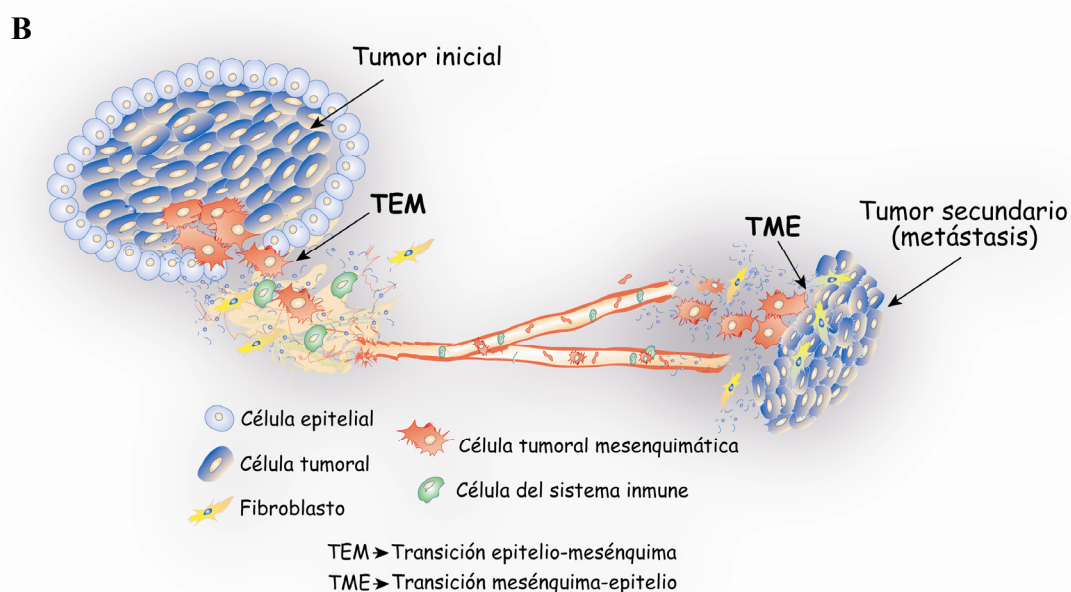
Otro fenómeno que engloba a la TEM, descrito en los últimos años, es el de dispersión celular o *scattering*. Durante este proceso, se desarrolla una TEM incompleta y algunos factores epiteliales y mesenquimáticos son expresados a la vez en la célula (Gotzmann et al., 2004; Lee et al., 2006) (Fig. 1A).

Por otra parte, el proceso de TEM es un proceso dinámico y transitorio durante el desarrollo, observándose el proceso de transición mesénquima-epitelio (TME) en diferentes contextos embrionarios. De igual forma, se ha postulado la existencia de situaciones similares en la progresión tumoral (Fig. 1B) (Peinado et al., 2004a; Thiery, 2002).

Actualmente, distintas evidencias experimentales apoyan que la TEM ocurre durante la progresión tumoral, estando asociada a invasividad y agresividad del tumor. Sin embargo, todavía existe controversia, principalmente entre los patólogos, sobre la relevancia biológica de la TEM en la progresión tumoral y su manifestación en tumores invasivos (Christiansen and Rajasekaran, 2006; Tarin et al., 2005).



**Fig. 1 La TEM como proceso proceso dinámico.** **A** Esquema de los eventos principales del proceso de TEM. Las células pierden la adhesión celular y la polaridad, acompañado por cambios en el citoesqueleto y el aumento de la motilidad celular. **B** Procesos de TEM y de TME en la progresión tumoral. Las células, en algunos casos, después del proceso de TEM, son capaces de readquirir características epiteliales en un proceso conocido como TME. Adaptado de (Peinado et al., 2007).





## 2. Descripción de las cadherinas y su importancia biológica

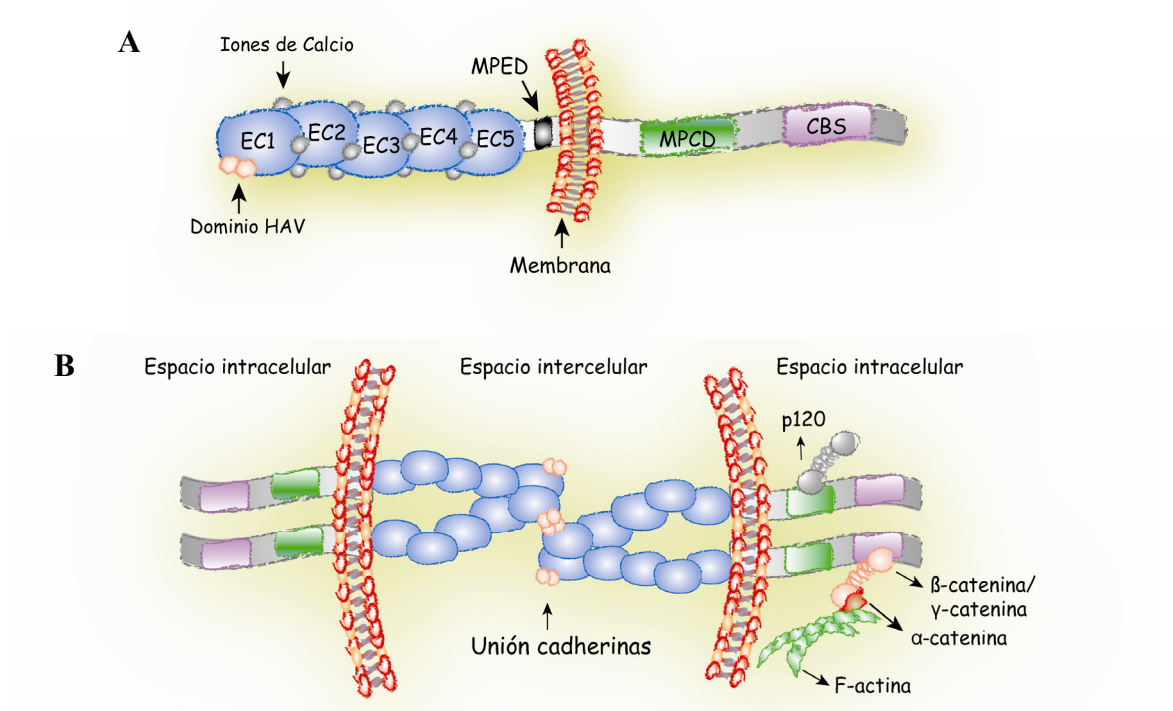
Las cadherinas son glucoproteínas transmembrana, que a través de interacciones homotípicas con células adyacentes, forman uniones adherentes entre las células, de una forma dependiente de calcio. Los cambios dinámicos que ocurren en la adhesión celular mediada por diferentes cadherinas, son clave durante el proceso de embriogénesis (Gumbiner, 2005). Actualmente, se conocen más de 80 miembros de la superfamilia de las cadherinas en vertebrados e invertebrados. Para su clasificación, se recurre a su estructura y organización funcional. De este modo se han dividido en cinco subfamilias: las cadherinas tipo I o clásicas, las cadherinas tipo-II o atípicas, las cadherinas desmosomales (desmocollinas y desmogleínas), y otras proteínas relacionadas estructuralmente con las cadherinas, como son las protocadherinas, las cadherinas Flamingo y las cadherinas tipo Fat (Nollet et al., 2000; Peinado et al., 2004a).

### 2.1. Complejos de unión cadherina-E-cateninas

La cadherina-E (*CDH1*), pertenece al grupo de las cadherina tipo I o clásicas. El locus genético del gen de *CDH1* humano se encuentra en la región 16q22.1 del cromosoma 8, comprende 16 exones y tiene una longitud de 99 Kb. En la actualidad, se considera una molécula esencial durante el desarrollo embrionario y su expresión se asocia a la formación y mantenimiento de todos los tejidos epiteliales (Takeichi, 1988a; Takeichi, 1988b; Takeichi, 1995).

La cadherina-E actúa como receptor principal en las uniones adherentes de los tejidos epiteliales. En la membrana celular, la cadherina-E se encuentra formando homodímeros unidos al citoesqueleto de actina dentro de un complejo multiproteico que incluye  $\alpha$ -catenina,  $\beta$ -catenina, y catenina p120 (Nollet et al., 2000; Takeichi, 1990). La cadherina-E presenta una estructura característica, con una región extracelular con cinco ectodominios (EC), denominados EC1- EC5, y un dominio extracelular adicional, próximo a la membrana, llamado MPED (Fig.2A). Los dominios EC son responsables, por una parte, de mediar la interacción homotípica (a través de secuencias específicas HAV, localizadas en EC1), así como de unir iones de calcio, los cuales confieren estabilidad a la región extracelular y posibilitan la conformación adecuada para las interacciones célula-célula (Chappuis-Flament et al., 2001; Leckband and Sivasankar, 2000; Pertz et al., 1999). Por otra parte, la región citoplasmática contiene un dominio conservado próximo a la membrana, llamado MPCD, y una secuencia de unión a cateninas o CBS (Perez-Moreno and Fuchs, 2006). Las cateninas que se unen directamente al dominio CBS de la cadherina-E, son  $\beta$ -catenina y  $\gamma$ -catenina/plakoglobina, de forma excluyente (Lozano and Cano, 1998; Ozawa et al., 1989; Stappert and Kemler, 1994), mientras que p120 se une al MPCD. La plakoglobina y la  $\beta$ -catenina sirven de unión entre cadherina-E y la región aminoterminal de la  $\alpha$ -catenina que conecta al complejo de membrana directa o indirectamente con el citoesqueleto de actina (Fig.2B) (Knudsen et al., 1995; Rimm et al., 1995).

La  $\alpha$ -catenina, es necesaria para la función adhesiva de las cadherinas clásicas (Hirano et al., 1992; Shimoyama et al., 1992; Watabe et al., 1994), si bien su papel en este proceso se ha cuestionado recientemente (Nelson and Nusse, 2004). Por otra parte,  $\beta$ -catenina tiene una importante función señalizadora en la vía Wnt, cuando se encuentra disociada de los complejos de adhesión y estabilizada en el citoplasma (Behrens, 1999; Nelson and Nusse, 2004). Por tanto, la unión de cadherina-E a  $\beta$ -catenina en los contactos intercelulares, impediría que ésta ejerciese su función señalizadora (Fagotto et al., 1996; Wong and Gumbiner, 2003).



**Fig. 2 Representación esquemática de la estructura de los complejos cadherina-E/cateninas.** A Estructura de cadherina-E anclada a la membrana. B Estructura de la uniones mediadas por cadherina-E y las asociaciones de cateninas. Se representan los dominios extracelulares (EC1-EC5) y MPED, y los intracelulares MPCD y CBS.

## 2.2. Cadherina-E durante la progresión tumoral

A lo largo de las dos últimas décadas, numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la cadherina-E durante el desarrollo embrionario, en el establecimiento de la polaridad celular, y en el mantenimiento del fenotipo, la morfología y arquitectura de los epitelios (Larue et al., 1996; Takeichi, 1988b). Pero además, el establecimiento de uniones mediadas por cadherina-E también se ha implicado en la supervivencia celular (Day et al., 1999), en el control de la proliferación celular (Kandikonda et al., 1996; St Croix et al., 1998; Takahashi and Suzuki, 1996), y en la motilidad celular (Braga, 1999; Braga, 2002; Yap and Kovacs, 2003).

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que durante la progresión tumoral, los contactos celulares sufren cambios dramáticos en las uniones mediadas por cadherina-E, considerándose

actualmente la pérdida de cadherina-E como uno de los eventos esenciales para la TEM y la invasión tumoral (Peinado et al., 2004a; Thiery, 2002).

Estudios en profundidad del gen de *CDH1* y su regulación durante la progresión tumoral, han dado importantes claves para avanzar en los mecanismos moleculares que participan en la invasión tumoral. Entre ellos, cabe destacar los estudios que evidencian la asociación entre la pérdida de expresión y función de cadherina-E y el grado de diferenciación y progresión de los carcinomas (Birchmeier and Behrens, 1994; Hajra and Fearon, 2002; Takeichi, 1993), o aquellos en donde se pone de manifiesto la relación entre la pérdida de funcionalidad de la cadherina-E, con el aumento en la expresión de marcadores mesenquimáticos y la adquisición de propiedades migratorias e invasivas (Behrens et al., 1992; Christofori and Semb, 1999; Semb and Christofori, 1998). No obstante, de la misma forma que sucede durante el desarrollo embrionario, la pérdida de expresión de cadherina-E es un proceso dinámico. Durante la progresión tumoral y en diversos tumores como los de mama o colon, se ha visto re-expresión de cadherina-E y re-adquisición de fenotipo epitelial, asociados a procesos de TME, en tumores secundarios o metástasis (Brabletz et al., 2001; Caulin et al., 1996; Gamallo et al., 1993).

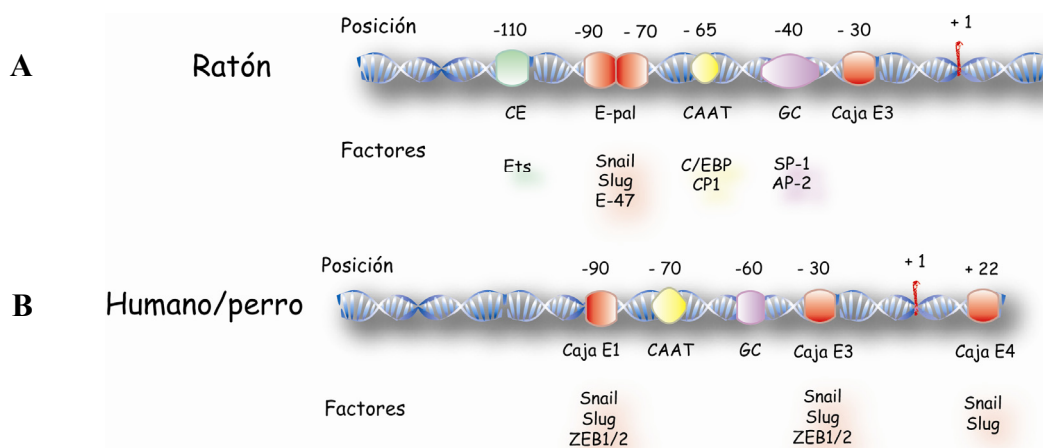
Hoy en día, se conocen varios mecanismos implicados en la regulación de la expresión del gen de *CDH1*. Entre ellos, destacan cambios epigenéticos del locus de *CDH1*, así como mecanismos de regulación transcripcional (Peinado et al., 2004a; Strathdee, 2002). La regulación transcripcional se considera actualmente un evento fundamental durante el silenciamiento dinámico del gen *CDH1* durante la progresión tumoral (Peinado and Cano, 2005). En consecuencia, varios factores de transcripción identificados recientemente como potentes represores transcripcionales del gen *CDH1*, han despertado un gran interés por sus posibles implicaciones clínicas (Peinado et al., 2007).

### **3. Factores de transcripción implicados en la pérdida de expresión de *CDH1* e inductores de TEM**

El promotor proximal de *cdh1* de ratón fue aislado por primera vez en 1991, permitiendo conocer su composición y organización. Consta de una caja CCAAT (-65), una región rica en GC (-30 a -58) y una región palindrómica (-70 a -90), llamada región E-pal, compuesta de dos cajas E adyacentes (CAGGTG), caja E1 y caja E2, flanqueadas por cuatro nucleótidos invertidos (Behrens et al., 1991) (Fig.3). Tanto la caja CCAAT como la región rica en GC son esenciales para la expresión basal del gen de cadherina-E, siendo reconocidas por factores de transcripción ubicuos, como AP2, SP1, entre otros (Behrens et al., 1991; Faraldo et al., 1997; Hennig et al., 1996; Peinado et al., 2004a). Por otra parte, la región Epal, a la cual en principio se le atribuyó una función activadora en células epiteliales (Behrens et al., 1991), se caracterizó posteriormente como una región represora en células deficientes en cadherina-E (Faraldo et al., 1997; Hennig et al., 1996; Rodrigo et al., 1999) (Fig.3). Más recientemente, análisis comparativos del promotor aislado de distintas especies (humano, ratón y perro) han demostrado, que los elementos reguladores del promotor de cadherina-E se hallan conservados

incluyendo la localización de una tercera caja E proximal (caja E3) situada en la posición -30 en las tres especies analizadas (Comijn et al., 2001). Sólo como excepción, cabe destacar, una caja E adicional (caja E4, +30) que se encuentra en el promotor humano y de perro (Batlle et al., 2000), y la ausencia de conservación de la caja E2 (distal) del E-pal (Comijn et al., 2001; Hennig et al., 1996) (Fig.3). Curiosamente, todas las caja E identificadas en el promotor proximal de *CDHI*, responden a la secuencia (CAGGTG).

En los últimos años, se han caracterizado varios factores de transcripción que a través de su interacción con las cajas E, reprimen la transcripción de *CDHI* (Fig.3). Entre ellos se hallan factores de la familia Snail de dedos de zinc, Snail (*Snail1*) (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000) y Slug (*Snail2*) (Bolos et al., 2003; Hajra et al., 2002), de la familia de dobles dedos de zinc  $\delta$ EF1 (*ZEB-1*) y SIP-1 (*ZEB-2*) (Comijn et al., 2001; Eger et al., 2005; Grootclaes and Frisch, 2000) y de la familia bHLH como E12/E47 (Perez-Moreno et al., 2001), E2-2 (Sobrado, V., Cano, A. y col., en preparación) y Twist (Yang et al., 2004).



**Fig. 3 Representación esquemática de la estructura del promotor proximal de cadherina-E.** Estructura del promotor de cadherina-E, **A** de ratón y **B** humano/perro, con la posición de los sitios de interacción de los factores indicados respecto al inicio (+1) de la transcripción. Adaptado de (Peinado et al., 2004a).

### 3.1. Factores de la superfamilia Snail: Snail y Slug

Las proteínas de la superfamilia de Snail, Snail (*Snail1*) y Slug (*Snail2*), están implicadas en diversas fases del desarrollo embrionario y otros procesos biológicos, como el movimiento celular y la supervivencia, y se consideran moléculas clave durante la TEM (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005; Nieto, 2002). Fueron descritas inicialmente, en diferentes sistemas experimentales, como represores transcripcionales (Hemavathy et al., 2000a; Hemavathy et al., 2000b; Nieto, 2002). Tanto Snail como Slug, contienen dominios de unión al DNA, constituidos por varios motivos de dedos de zinc (4 a 6, según la especie), a través de los cuales son capaces de interaccionar con secuencias consenso de unión al DNA del tipo caja E<sup>C</sup>/<sub>A</sub>(CAGGTG) (Fuse et al., 1994; Hemavathy et al., 2000a; Hemavathy et al., 2000b; Inukai et al., 1999; Kataoka et al., 2000; Mauhin et al., 1993).

Ambos factores, cuentan con un dominio SNAG (presente en proteínas de la familia Snail y Gfi), constituido por ocho aminoácidos conservados (MPRSFLVK) (Nakayama et al., 1998b), requerido para la actividad represora de ambos factores (Batlle et al., 2000; Hemavathy et al., 2000b; Peinado et al., 2004b).

La caracterización funcional de Snail demostró, que actúa como un fuerte represor del promotor de cadherina-E. Para ello, es fundamental la interacción con el elemento E-pal del promotor, en el caso del promotor murino (Cano et al., 2000), y con las cajas E del promotor humano (Batlle et al., 2000) (Fig.3A y B). Un mecanismo similar se ha observado para la acción represora de Slug (Bolos et al., 2003; Hajra et al., 2002), si bien, la afinidad de interacción de Snail con el elemento E-pal es mucho mayor que la de Slug (Bolos et al., 2003).

En los últimos años, se ha descrito como Snail recluta un complejo co-represor (mSin3A/histonas deacetilasas 1 y 2 (HDACs 1 y 2)), a través del dominio SNAG, para su unión y posterior represión del promotor murino de cadherina-E (Peinado et al., 2004b). Sin embargo, en el caso de Slug, se ha propuesto un mecanismo distinto de represión, por el cual el dominio parcialmente conservado de interacción con CtBP y su reclutamiento, junto a HDACs, son necesarios para que Slug pueda ejercer su función represora (Hemavathy et al., 2000b). Tanto la sobreexpresión de Snail como de Slug en células epiteliales, induce TEM, adquisición de propiedades migratorias y un comportamiento invasivo *in vitro* (Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000). Adicionalmente, se ha podido comprobar que existe una correlación inversa entre la expresión de Snail y/o Slug y cadherina-E en diferentes tipos tumorales (Peinado et al., 2007).

### **3.2. Factores de la familia ZEB**

Los dos miembros conocidos de la familia ZEB (dobles dedos de zinc y *homeobox*) también han sido descritos como represores de *CDHI* por su interacción con las cajas E2 y E3 del promotor humano (Comijn et al., 2001; Eger et al., 2005; Grooteclaes and Frisch, 2000). Durante los últimos años, diversos estudios han mostrado que estos factores pueden actuar como represores o activadores transcripcionales, dependiendo de la interacción con co-represores (CtBP) o co-activadores (CBP/p300) (Postigo et al., 2003), para ejercer su función en determinados contextos. Sin embargo, el mecanismo específico de represión de *CDHI* ejercido por los factores ZEB es todavía desconocido, en gran medida (Shi et al., 2003; van Grunsven et al., 2003). Un número creciente de estudios, muestra la expresión de factores ZEB asociados a progresión tumoral de carcinomas escamosos y de colon, entre otros (Peinado et al., 2007).

### 3.3. Factores de la familia bHLH: E47, E22A/B y Twist

La familia de factores de transcripción tipo HLH, se denomina así por la presencia de un dominio estructural hélice-lazo-hélice (HLH), formado por dos hélices- $\alpha$  anfipáticas separadas por una región flexible no helicoidal, esencial para la dimerización. La mayoría de estos factores, presentan una región básica adyacente al motivo HLH en su extremo N-terminal, que les permite unirse al surco mayor del DNA (Davis et al., 1990; Ellenberger et al., 1994; Voronova and Baltimore, 1990), por ello nos referimos al dominio de unión al DNA y de dimerización como dominio bHLH. Las secuencias más comunes de unión al DNA, son cajas E del tipo (CANNTG) (Ephrussi et al., 1985; Kiledjian et al., 1988; Lassar et al., 1989), siendo necesario la dimerización de los factores bHLH para la interacción con el DNA (Murre et al., 1989). Hoy en día se conocen 240 factores HLH, clasificados en siete clases (I-VII), según su distribución tisular, su capacidad de dimerización y su unión específica al DNA (Tabla 1) (Massari and Murre, 2000).

Uno de los factores bHLH implicado en la represión del gen *CDHI*, es el factor E47 (Perez-Moreno et al., 2001), el cual se ha observado que interacciona con el elemento E-pal del promotor de *cdh1* con afinidad intermedia a los factores Snail y Slug (Bolos et al., 2003). El factor E47 se genera mediante *splicing* alternativo del exón codificante para la región bHLH, a partir del producto de un único gen (*E2A* (*TCF3*)) (Murre et al., 1989; Watada et al., 1995). Adicionalmente, este suceso puede generar otra proteína llamada E12. Tanto E47 como E12, son factores de clase I, y su dominio HLH difiere en un 20% en su secuencia aminopeptídica (Aronheim et al., 1993b). Como toda la familia de factores bHLH clase I (también denominados proteínas E), E47 y E12, contienen un dominio bHLH, y dos dominios de transactivación en el extremo aminoterminal y central altamente conservados (DA1 y DA2), los cuales funcionan como activadores de la transcripción (Aronheim et al., 1993a). Los productos del gen *E2A*, juegan un papel esencial en la determinación de varios linajes celulares, principalmente células B y células de músculo esquelético (Bain et al., 1994; Kee and Murre, 1998), así como en la inducción de la TEM tanto en desarrollo embrionario como durante la progresión tumoral (Perez-Moreno et al., 2001). Otro regulador de la expresión de *CDHI*, es el factor de transcripción bHLH clase II Twist, descrito como necesario para la formación del mesodermo durante la gastrulación en *Drosophila melanogaster* (Castanon and Baylies, 2002). Estudios realizados en líneas celulares de mama, mostraron que la sobreexpresión de Twist inducía un proceso de dispersión celular o *scattering*, asociado a inducción de TEM durante la invasión tumoral. Actualmente, se sabe que Twist actúa como represor de *CDHI*, si bien todavía no se ha demostrado la unión directa del factor a ninguna secuencia consenso del promotor (Yang et al., 2004). La expresión de Twist se ha visto asociada a progresión tumoral y en algunos casos a mal pronóstico en diversos tipos tumorales (Peinado et al., 2007).

Por último, dentro de los factores HLH, nuestro grupo, ha caracterizado otros dos factores implicados en la represión del gen de *CDHI* e inducción de TEM, los factores E2-2A (ITF-2A) y E2-2B (ITF-2B) (V.Sobrado, A.Cano y col., en preparación). Ambas proteínas, las cuales difieren en su extremo aminoterminal, se generan a partir de un único gen, *TCF4* (también llamado *E2-2*, *SEF-2* e *ITF2*) y pertenecen a la familia de factores HLH clase I (Corneliussen et al., 1991; Henthorn et al., 1990; Skerjanc et al., 1996; Soosaar et al., 1994). Los factores E2-2 se han visto implicados en transformación neoplásica en adenocarcinomas de ovario, asociado a desregulación de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Kolligs et al., 2002; Zhai et al., 2002). Más recientemente, nuestro grupo ha demostrado mediante análisis comparativo de expresión génica, que los factores E2-2 (*TCF4*) se hallan sobreexpresados en la línea celular MDCK, que expresa establemente los factores Snail, Slug o E47 (Moreno-Bueno et al., 2006), lo que sugiere una relación funcional entre los distintos factores reguladores de *CDHI* y de la TEM.

Los estudios recientes de expresión génica han puesto, asimismo, de manifiesto la existencia de alrededor de 240 genes que podrían estar regulados por los factores Snail, Slug y E47 de forma común o diferencial en células MDCK. Entre los genes regulados por los tres factores, se encuentran genes implicados en TEM, otros relacionados con la regulación transcripcional y post-transcripcional, y algunos implicados en el control del ciclo celular, en apoptosis o en angiogénesis. Dentro de los genes implicados en regulación transcripcional, se encontró el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), cuya expresión se hallaba notablemente reprimida por la sobreexpresión de cada uno de los tres factores (Snail, Slug y E47) en células MDCK (Moreno-Bueno et al., 2006).

#### **4. El factor de transcripción asociado a microftalmia**

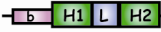
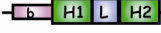
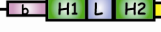




El factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF/Mitf), es un factor de la familia bHLH clase III (Massari and Murre, 2000) (Tabla 1), implicado en desarrollo embrionario y esencial para la determinación de varios linajes celulares como melanocitos, mastocitos, osteoclastos y células del epitelio de la retina pigmentada (RPE); además, es capaz de modular señales tanto intra como extracelulares (Hodgkinson et al., 1993; McGill et al., 2002; Oboki et al., 2002; Partington et al., 2004; Steingrimsson et al., 2004; Udonio et al., 2000; Widlund and Fisher, 2003).

El factor MITF presenta, en la región central, un dominio bHLH unido a una cremallera de leucinas (LZ), que media su posible dimerización y unión al DNA y junto a él, dos dominios de transactivación (DA) (Fig.4). Como el resto de factores bHLH, posee la capacidad de unión específica a cajas E tipo CANNTG, aunque MITF tiene preferencia por cajas E del tipo CACGTG, CACATG y CATGTG (Bentley et al., 1994; Hemesath et al., 1994; Vetrini et al., 2004; Yasumoto et al., 1994).

Existen diversas isoformas de MITF denominadas: A, B, C, D, E, H, J, M y MC, las cuales comparten los dominios bHLH-LZ y de transactivación, pero difieren en el extremo aminoterminal (Hershey and Fisher, 2005; Levy et al., 2006; Oboki et al., 2002; Shibahara et al., 2001; Shibahara et al., 1999; Tachibana, 2000; Takeda et al., 2002; Takemoto et al., 2002) (Fig.5B). Si las distintas regiones aminoterminales de las distintas isoformas de MITF confieren diversas propiedades para cada proteína, o si simplemente reflejan el hecho de una sofisticada regulación de la expresión espacio-temporal, son aspectos que todavía quedan por clarificar.

Una característica del factor MITF, es su capacidad de funcionar como homodímeros o heterodímeros durante su interacción con el DNA, aunque de momento esto sólo ha sido demostrado con la isoforma M (Hemesath et al., 1994). Varios factores de la familia bHLH-LZ clase III, son capaces de heterodimerizar con MITF, entre ellos, la familia de factores EB (TFEB, TFE3 y TFEC) (Tabla 1) (Hemesath et al., 1994). Todos ellos junto con MITF, poseen dominios bHLH-LZ y dominios de transactivación altamente conservados y forman la subfamilia de factores de transcripción MiT (Hemesath et al., 1994). Hoy en día, todavía no conocemos con exactitud cuando estos factores actúan como homo o heterodímeros.

**Tabla 1. Descripción de las distintas familias de factores HLH.**  
Adaptado de (Massari and Murre, 2000).

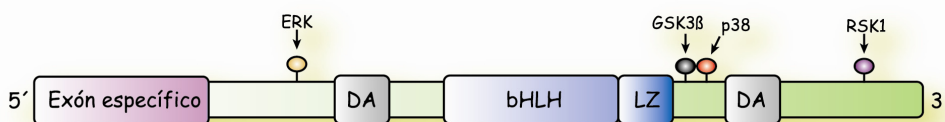
	Características	Ejemplos	Funciones
Clase I	 Homo-o heterodimerizan	E12/E47 y E2-2A /B (proteínas E)	Linfogénesis, Miogénesis, Neurogénesis etc.
Clase II	 Heterodimerizan con bHLH Clase I	MyoD, NeuroD, Twist	Linfogénesis, Miogénesis, etc.
Clase III	 Cremallera de Leucinas adyacente al dominio bHLH	Subfamilia MiT (MITF, TFEB, TFEC y TFE3) y Myc	Proliferación, diferenciación, apoptosis, etc.
Clase IV	 Heterodimerizan con Myc	Max y Mad	Proliferación, etc.
Clase V	 Dominantes negativos de bHLH clase I y II (carentes de dominio básico)	Factores Id	Angiogénesis, proliferación, etc
Clase VI	 Prolina en la región básica	HES y HERS1	Ruta de señalización de Notch, proliferación, etc.
Clase VII	 Dominio PAS adyacente al dominio bHLH	AHR y HIFa	Respuesta a hidrocarburos aromáticos, hipoxia, etc.

HLH: dominio hélice-lazo-hélice, b: dominio básico;  
LZ: cremallera de leucinas; PAS: dominio PAS.



La ausencia de expresión de TFE3 y TFEB durante la formación de la cresta neural, sugiere que durante este estadio del desarrollo embrionario, MITF puede actuar como homodímero (Goding, 2000; Verastegui et al., 2000a). Por otra parte, durante el desarrollo de melanocitos, MITF-M es el único miembro de la subfamilia MiT esencial (Goding, 2000), mientras que otros estudios han demostrado redundancia génica y funcional entre MITF-M y TFE3 durante el desarrollo de osteoclastos (Steingrimsdóttir et al., 2002). Adicionalmente, y con una menor relevancia, se ha visto la implicación de otro factor bHLH-LZ, USF2, en la heterodimerización de MITF y su requerimiento durante la expresión de genes de interleuquinas e IgE en mastocitos murinos (Nechushtan et al., 1997).

La relevancia biológica de los factores MITF, se puso de manifiesto por la descripción de mutaciones, en concreto en MITF-M, implicadas en deficiencias en muchos tipos celulares, entre ellos melanocitos, células RPE, osteoclastos, mastocitos y células NK, principalmente (Moore, 1995). De hecho, en ratones, ha podido ser observado como mutaciones en MITF-M producen una maduración incompleta de los osteoclastos, lo que se traduce en animales con osteopetrosis, enfermedad que cursa con distintas malformaciones en los huesos (Hershey and Fisher, 2004). Por otra parte, en humanos, se han descrito mutaciones en el factor MITF-M como causantes del síndrome Waardenburg tipo IIa y del síndrome Tietz (caracterizado por sordera sensorial e hipopigmentación entre otros muchos síntomas) (Amiel et al., 1998; Tassabehji et al., 1994), que se comentarán más adelante.



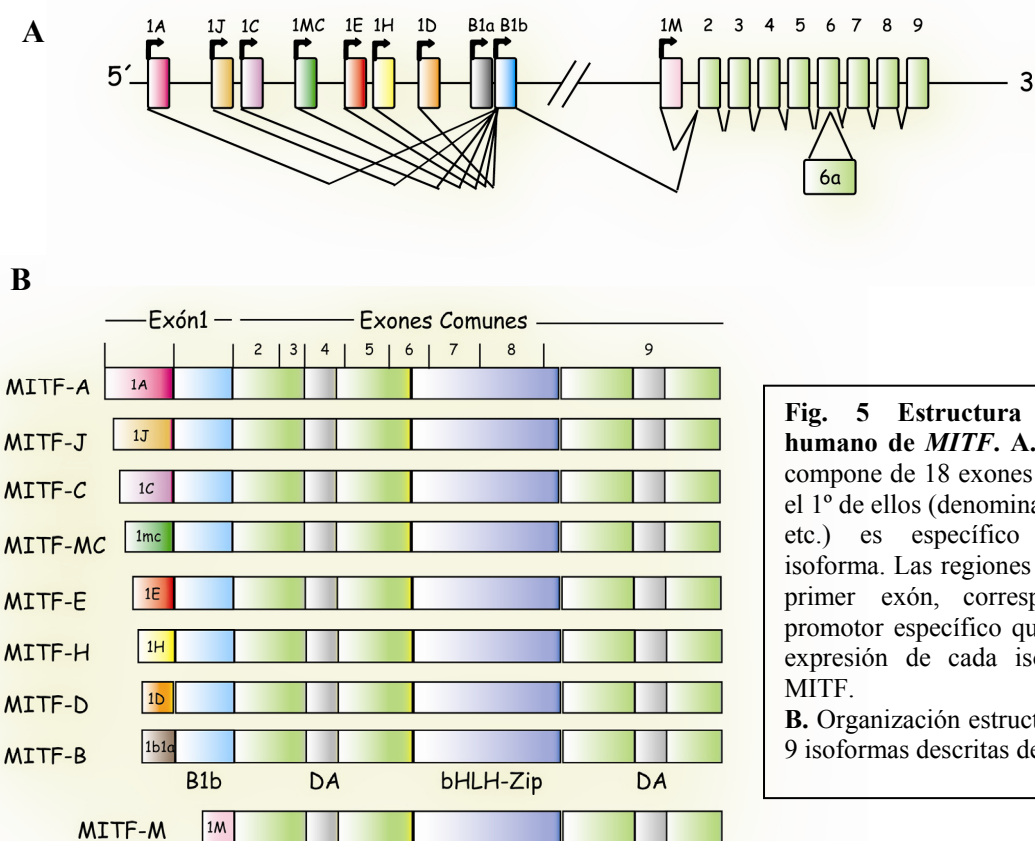
**Fig. 4 Representación esquemática del factor MITF.** Esquema de los principales dominios funcionales de MITF. En el extremo 5' se indica la posición del exón específico para cada isoforma. Asimismo, se indica la posición de los principales sitios de fosforilación de MITF, por las quinasas indicadas. DA: dominio de transactivación; bHLH: región básica seguida de un dominio hélice-lazo-hélice; LZ: cremallera de leucinas.

#### 4.1. Regulación transcripcional de MITF

##### 4.1.1. Control de la transcripción mediante promotores alternativos

Una de las características que definen a los factores MITF, es el mecanismo de regulación transcripcional bajo la dirección de distintos tipos de promotores, ubicuos o específicos de tejido (Udono et al., 2000). En humanos, se han descrito hasta nueve promotores alternativos para dirigir la expresión diferencial de MITF (Hershey and Fisher, 2005; Levy et al., 2006) (Fig.5A). Estos promotores son los encargados de conferir especificidad 5' a cada transcrito. Para la mayoría de isoformas, el exón inicial, específico de cada isoforma, es ensamblado con la región más

carboxiterminal del exón 1B (1B1b), y tras esto, el resto de exones comunes (del 2 al 9), encargados de codificar los dominios funcionales de las distintas isoformas de MITF (Fig.5). Estos dominios abarcan, además del dominio de transactivación y de la región bHLH-LZ, varios dominios de fosforilación. En el caso de la isoforma M, el promotor específico o promotor M, es el más próximo a los exones comunes y dirige la expresión del exón 1M, el cual es ensamblado a los exones 2-9 directamente, careciendo por tanto del exón 1B1b (Hershey and Fisher, 2005) (Fig.5A). La expresión del promotor M y del exón 1M, conlleva la adición de un pequeño número de aminoácidos específicos que hacen que la isoforma MITF-M sea capaz de promover los cambios necesarios para la diferenciación y maduración de los melanocitos (Fuse et al., 1996).



**Fig. 5 Estructura del gen humano de MITF.** A. El gen se compone de 18 exones de los que el 1º de ellos (denominado 1A, 1J, etc.) es específico de cada isoforma. Las regiones 5' de cada primer exón, corresponden al promotor específico que dirige la expresión de cada isoforma de MITF.

B. Organización estructural de las 9 isoformas descritas de MITF.

En la mayoría de isoformas, la traducción comienza dentro del primer exón (Amae et al., 1998) (Fuse et al., 1999) (Takemoto et al., 2002) (Amae et al., 1998; Steingrimsdottir et al., 1994); (Hodgkinson et al., 1993; Tassabehji et al., 1994; Udonio et al., 2000), excepto en el caso de Mitf-E (Oboki et al., 2002) y MITF-D/Mitf-D (Takeda et al., 2002), debido a la falta de una metionina iniciadora en el exón 1E y 1D. Estos dos últimos transcritos, codifican por tanto, la misma proteína, la cual tiene su inicio de transcripción dentro del exón 1B1b (Oboki et al., 2002; Takeda et al., 2002) (Fig.5B). Una situación

similar puede ocurrir para la isoforma MITF-J (Hershey and Fisher, 2005), ya que no se han encontrado ORF (marcos de lectura abiertos o *open reading frames*) dentro del exón 1J.

Un nivel similar de complejidad, ha sido recientemente descubierto en dos factores de la subfamilia MiT: TFEB y TFEC. En concreto, TFEB comprende siete primeros exones alternativos, y TFEC contiene al menos tres (Kuiper et al., 2004).

Las distintas isoformas de MITF presentan cierta especificidad celular y funcionalidad biológica. De todas las isoformas, la mejor conocida actualmente es MITF-M, cuya expresión y regulación ha sido ampliamente estudiada en melanocitos, mientras que el resto de isoformas han sido poco analizadas. Hasta la fecha, únicamente se ha investigado la regulación de las distintas isoformas de MITF en mastocitos, en donde se ha analizado la expresión de las isoformas MITF-A, MITF-Mc, MITF-H y MITF-E (Oboki et al., 2002; Takemoto et al., 2002). Sin embargo, las funciones biológicas de las mismas, nunca han sido investigadas. Investigaciones recientes, han puesto de manifiesto que la diferencias específicas de tejido en la expresión y regulación de MITF y sus distintas isoformas, parecen depender de estímulos fisiológicos dependientes del tipo celular (Tshori et al., 2007).

Adicionalmente a todas las isoformas de MITF descritas anteriormente, cabe destacar la existencia de dos variantes más, MITF(+) y MITF(-), generadas a partir de *splicing* alternativo. Estas dos variantes, provienen de dos mRNA generados a partir del uso alternativo de dos sitios aceptores localizados en el exón 6, en donde se insertará o no una secuencia de 18pb (exón 6a) (Fig.5A) (Hodgkinson et al., 1993; Steingrimsson et al., 1994). Hasta hace unos años se pensaba que las dos únicas isoformas que eran capaces de ser expresadas como (+) y como (-) eran MITF-A, MITF-M y MITF-H (Hallsson et al., 2000); sin embargo, actualmente este mecanismo ha sido descrito para otras isoformas como MITF-E, MITF-J y MITF-Mc (Murakami et al., 2007). Entre las características que distinguen a ambas variantes de MITF, se ha propuesto que la isoforma (+) tiene una mayor afinidad de unión al DNA que la isoforma (-), pero esto sólo ha sido analizado cuando MITF actúa como homodímero (Hemesath et al., 1994). Por otra parte, estudios recientes han demostrado la capacidad de MITF-M (+) para inhibir la síntesis de DNA, sugiriendo el requerimiento del extremo aminoterminal y del exón 6a del factor en el proceso (Bismuth et al., 2005).

#### **4.1.2. Factores reguladores de la transcripción de MITF**

La regulación transcripcional de *MITF*, ha sido estudiada principalmente en melanocitos, debido a la gran importancia de la isoforma M durante la biología de estas células y durante la progresión del melanoma. Sin embargo, muy poco se sabe acerca de su regulación y de su expresión en otros tipos celulares. Se conoce, que el promotor de *MITF-M* es diana de una amplia variedad de factores de transcripción, necesarios para el desarrollo de la cresta neural, entre otras funciones, pero la regulación de los promotores del resto de isoformas es todavía poco conocido. Entre los factores implicados en la

regulación positiva del promotor de la isoforma M, caben destacar PAX3, CREB, SRY, SOX10, LEF1, ONECUT-2 y el propio MITF-M, el cual es capaz de interaccionar con su propio promotor y así participar en su regulación transcripcional (Jacquemin et al., 2001; Potterf et al., 2000; Price et al., 1998b; Saito et al., 2002; Widlund and Fisher, 2003; Yasumoto et al., 2002). Acerca de la regulación negativa del promotor de MITF-M, hasta la fecha sólo se conocen dos inhibidores principales de su expresión: la proteína quinasa C1 (*PKC1* o *Hint*) (Razin et al., 1999) y la proteína inhibidora de la activación de STAT3, PIAS3 (Levy et al., 2002). En el caso de PKC1, estudios de doble híbrido en levaduras, han revelado su interacción y acción represora de la actividad transcripcional de MITF-M (Razin et al., 1999), postulando un nuevo tipo de moléculas que podrían actuar como co-represores de MITF.

### 4.2. Regulación postranscripcional

Además de la regulación transcripcional, el factor MITF también es objeto de varias modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la sumoilación.

#### 4.2.1. Fosforilación

La fosforilación, es un proceso primordial que regula las funciones y vida media de MITF-M, pudiendo estar mediada por distintas quinasas, como las activadas por mitógenos (MAPKs), la quinasa ribosomal 1 (RSK1), glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), y p38 (Mansky et al., 2002b; Takeda et al., 2000a; Weilbaecher et al., 2001; Wu et al., 2000). Durante, la diferenciación de los melanocitos, derivados de la cresta neural, la activación del receptor c-Kit por su ligando, el factor de acero (*steel factor*, Sl), inicia una cascada de señales que finalizan con la activación de ERK1/2 y la fosforilación de MITF-M (Fig.6). ERK2, interacciona establemente y con gran afinidad con MITF-M (Molina et al., 2005), fosforilándolo en la Ser73 (Hemesath et al., 1998) y facilitando el reclutamiento del co-activador transcripcional CBP/p300 (Price et al., 1998a; Sato et al., 1997). Adicionalmente, MITF-M puede ser fosforilado en la Ser409 por la RSK1, la cual es a su vez, activada por ERK (Wu et al., 2000). La fosforilación dual marca a MITF-M para ubiquitinización y degradación por el proteasoma (Fig.6) (Wu et al., 2000).

Adicionalmente, MITF-M puede ser fosforilado por GSK3 $\beta$ . Esta fosforilación, en la Ser298, aumenta la afinidad MITF-M al DNA (Takeda et al., 2000a). Así, en el caso de los melanocitos, mutaciones en la Ser298 impiden la fosforilación del factor y su unión a genes diana. Este hecho es relevante, ya que dicha mutación es la causante de una de las variantes del síndrome Waardenburg, detallado más adelante.

#### 4.2.2. Sumoilación

La sumoilación es el proceso a través del cual las proteínas SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) se unen covalentemente, a través de residuos de lisina, a la proteína sustrato. Estas proteínas, de pequeño tamaño y relacionadas con la familia de la ubiquitinas, juegan un papel esencial en la regulación postraduccional de muchas proteínas (Johnson, 2004; Melchior, 2000), habiéndose demostrado, en los últimos años, la participación de la sumoilación en la regulación positiva y negativa de la funcionalidad de muchos factores de transcripción (Johnson, 2004; Seeler and Dejean, 2003; Verger et al., 2003).

MITF-M puede ser sumoilado en dos residuos de lisina principalmente, la lisina 182 y la 316, mientras que la lisina 201 es modificada por ubiquitinización (Xu et al., 2000). Se ha descrito que la sumoilación de MITF modifica su actividad transcripcional, sin afectar a otras características del factor. De hecho, varios estudios han demostrado cómo MITF-M sumoilado regula negativamente la expresión de genes diana, aunque esta represión, curiosamente, sólo ha sido observada durante el control de promotores con más de un sitio de unión a MITF-M (Miller et al., 2005; Murakami and Arnheiter, 2005).

#### 4.3. Principales procesos celulares en los que se halla implicado MITF

MITF-M, ha sido descrito como un factor clave para el desarrollo de muchos tipos celulares, principalmente de melanocitos. Este hecho y su implicación durante la progresión del melanoma, hacen que este factor se encuentre en numerosas vías de señalización dentro de la célula (Goding, 2000; Levy et al., 2006). Los genes regulados por MITF-M, se han clasificado en varios grupos: genes implicados en crecimiento, supervivencia, diferenciación y motilidad celular (Levy et al., 2006) (Fig.6).

MITF-M regula la transcripción de los tres enzimas que son claves para la pigmentación: tirosinasa (*TYR*), proteína 1 asociada a la tirosinasa (*TYRP1*) y dopacromo tautomerasa (*DCT*). Estos genes son regulados por promotores que contienen cajas E de unión a MITF-M y son principalmente expresados en los melanosomas de los melanocitos (Bentley et al., 1994; Bertolotto et al., 1998; Hemesath et al., 1994; Yasumoto et al., 1994; Yasumoto et al., 1995; Yasumoto et al., 1997). Por otra parte, MITF-M, también regula otros genes con funciones poco conocidas, como el gen *AIM-1* (Fig.6). La ausencia de estos genes es la causa principal del albinismo oculocutáneo tipo IV en humanos (Du and Fisher, 2002). Adicionalmente, otra proteína implicada en la estructura de los melanosomas, PMEL17 (también llamada MART1 o gp100), actualmente utilizada para el diagnóstico de los melanomas (Du et al., 2003), también está regulada por MITF-M. La regulación de todos estos genes implicados en pigmentación, han llevado a definir a MITF-M como el regulador central de la melanogénesis

Estudios recientes, han demostrado que MITF-M podría regular al factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (*HIF1 $\alpha$* ), un modulador clave de las respuestas transcripcionales a hipoxia e implicado en varias vías,

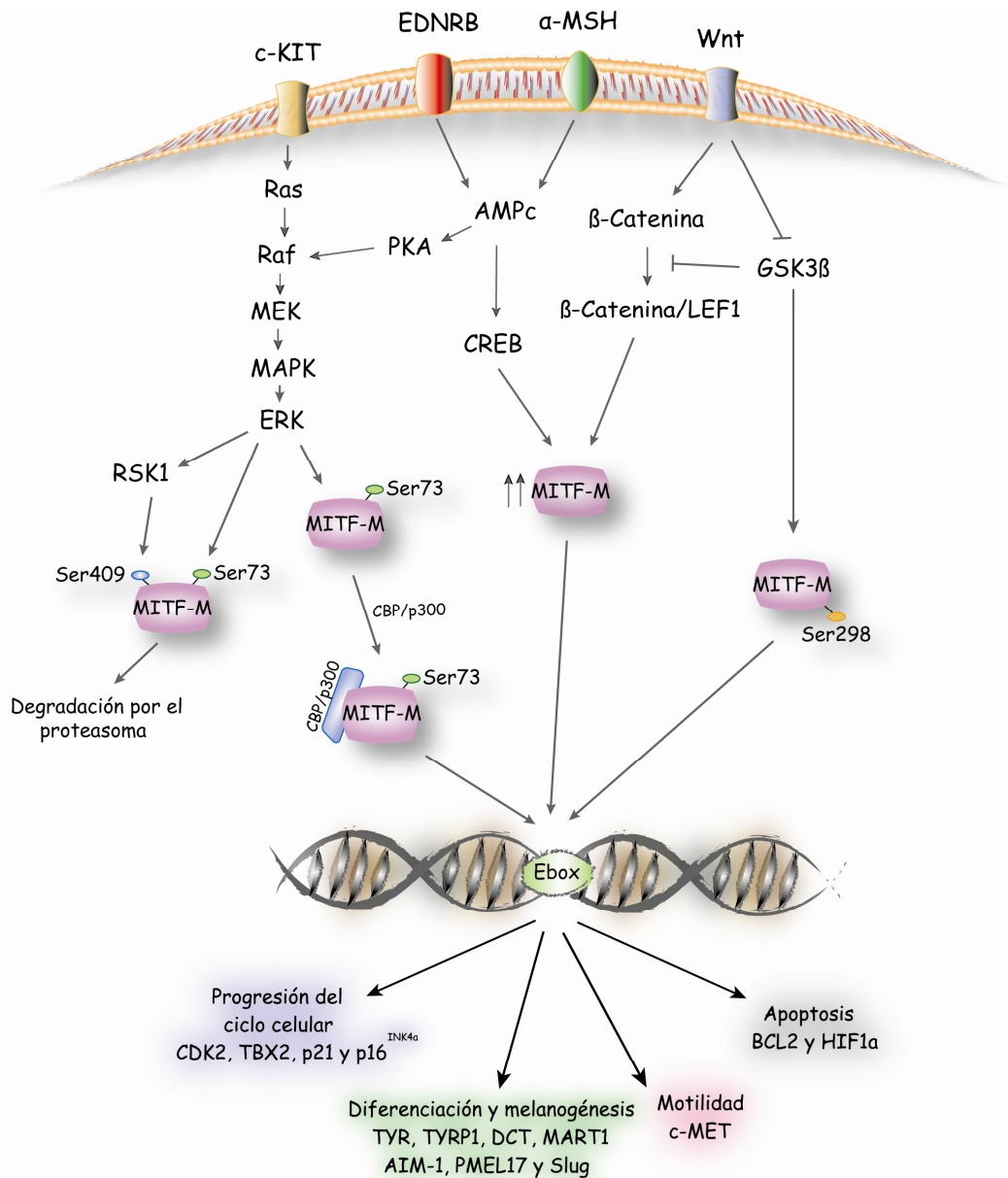
entre ellas la resistencia a apoptosis (Busca et al., 2005), lo que añadiría un mecanismo adicional de regulación (Fig.6). Otra diana transcripcional de este factor, es el protooncogén *c-MET*, inducido en melanocitos humanos transformados y relacionado con la capacidad metastática de los melanomas (McGill et al., 2006).

A su vez, MITF-M es regulado a través de varias rutas muy importantes en el desarrollo y diferenciación de los melanocitos. Una de ellas, es la vía regulada por la hormona  $\alpha$ -MSH, la cual a través de su unión con el receptor de melanocortina-1 (MC1R), promueve la activación de la vía del AMPc, que incide positivamente en la expresión de MITF-M (Fig. 6) (Busca and Ballotti, 2000; Busca et al., 1998). Pero sin duda, una de las vías relevantes en la regulación de la expresión de MITF-M, es la vía Wnt (Fig. 6). Las señales activadas a través de esta vía, son fundamentales, entre otras funciones, durante el desarrollo de la cresta neural (Dorsky et al., 1998). Significativamente, distintas regiones del promotor de MITF-M, contienen sitios de unión para los factores de transcripción Tcf/Lef, los cuales forman un complejo con  $\beta$ -catenina actuando como activadores transcripcionales de genes diana de la vía Wnt. Se ha descrito, que la expresión exógena de proteínas de la vía Wnt, transactivan el promotor de MITF-M, aumentando los niveles de mRNA de MITF-M en los melanocitos (Takeda et al., 2000b), sugiriendo que esta vía podría estar activando a MITF-M en células de melanoma.

### 4.3.1. Papel dual de MITF sobre el ciclo celular

En muchos tipos celulares, la diferenciación va acompañada por la parada y salida del ciclo celular; sin embargo, los melanocitos y las células de melanoma poseen la capacidad de expresar genes que promueven su diferenciación a la vez que continúan con la progresión del ciclo celular. Una conexión entre la progresión del ciclo celular y la diferenciación es posible gracias a MITF-M, que actúa como factor clave entre los genes que regulan la progresión del ciclo celular y los que promueven la diferenciación y maduración final de las células, caracterizado en melanocitos por la formación de melanina. Los melanocitos expresan grandes cantidades de tirosinasa (*TYR*), cuyo producto es crítico durante la biosíntesis de melanina, y de CDK2, regulador positivo del paso de G1 a S, durante la progresión del ciclo celular. Ambos genes, *TYR* y *CDK2*, son activados por MITF-M, a la vez que *Tbx2*, cuyo producto inhibe a *p21Cip1*, un potente regulador negativo de la progresión de G1 a S (Du et al., 2004; Prince et al., 2004; Steingrimsson et al., 2004; Steingrimsson et al., 2005; Vance and Goding, 2004). Simultáneamente otros estudios, han demostrado que *p21* también es activado directamente por MITF-M, así como otros inhibidores del ciclo celular como *INK4*, frecuentemente inactivo en los melanomas (Fig.6) (Carreira et al., 2005; Loercher et al., 2005). Por otra parte, la cooperación entre MITF-M y la proteína del retinoblastoma 1 (*Rb1*), estimula a *p21* y a la tirosinasa (Carreira et al., 2005). Dada esta complejidad, no es sorprendente, que MITF-M sea capaz de inhibir la proliferación celular bajo determinadas condiciones y promoverla bajo otras. Por ejemplo, así como en células RPE, MITF-M parece regular negativamente la proliferación (Nakayama et al., 1998a), en melanocitos,

MITF-M promueve su crecimiento y supervivencia (Opdecamp et al., 1997). Por tanto, MITF-M a través de la regulación temporal de distintos factores implicados en ciclo celular, puede controlar el balance entre proliferación y diferenciación en melanocitos.



**Fig. 6 Esquema de las principales vías de señalización y procesos celulares en los que se halla implicado MITF-M.** Representación esquemática de las principales vías en las que se ha descrito la función de MITF-M en melanocitos. MITF-M regula la transcripción de múltiples genes por la unión específica a determinadas cajas E, en el DNA. Los genes regulados por MITF-M, se han clasificado en cuatro grupos: genes implicados en crecimiento, supervivencia, diferenciación y motilidad celular. También se indican algunas de las principales vías que regulan a MITF-H a nivel transcripcional y post-transcripcional. EDNRB: receptor de la endotelina 3;  $\alpha$ -MSH: hormona estimuladora de melanocitos.

### **4.3.2. Apoptosis.**

Actualmente, se sabe que el desarrollo de mecanismos de resistencia a la apoptosis, es un paso crucial durante la tumorigénesis y en la resistencia a los tratamientos actuales de quimioterapia.

Un gran número de observaciones han demostrado la relación existente entre MITF-M y Bcl2 en células de melanoma (Fig.6). De hecho, los niveles de MITF y Bcl2 son mantenidos en la mayoría de los melanomas, a pesar de la pérdida de los marcadores más comunes en este tipo de tumores, como son la melanina y c-Kit. De hecho, Bcl2 se expresa ampliamente en los melanomas humanos y juega un papel fundamental, en la resistencia de estos tumores a los tratamientos de quimioterapia (Selzer et al., 1998). Actualmente, se sabe que uno de los papeles de MITF-M durante el avance del melanoma, es el de activar la expresión de Bcl2, lo que promueve señales antiapoptóticas (McGill et al., 2002), sobre todo en melanocitos que han sufrido daño celular provocado por los rayos ultravioletas (McGill et al., 2002). Contrariamente, otros estudios cuestionan la asociación de Bcl2 con la progresión de melanomas, ya que se ha observado que las células de melanoma reprimen la expresión de c-Kit (Janku et al., 2005), lo que impide la activación de MITF-M y consecuentemente de Bcl2 (Zhuang et al., 2007), asociando así la expresión de Bcl2 con un buen pronóstico de la enfermedad.

Otros estudios que cuestionan el papel antiapoptótico de MITF-M, son los que relacionan a caspasa-3 y una posible función proapoptótica de MITF-M en melanocitos humanos. Estos estudios, demuestran que la proteólisis de MITF-M aumenta la actividad proapoptótica en la célula (Larribere et al., 2005).

Estos datos muestran el papel dual que MITF juega durante la apoptosis. Una hipótesis que explicaría esta dualidad, es aquella en la que se pone de manifiesto como los melanocitos necesitan un nivel mínimo de MITF-M que garantice su supervivencia a través de la activación de distintos factores antiapoptóticos como Bcl2. Sin embargo, los niveles de MITF-M deben estar estrictamente regulados para evitar señales antiproliferativas incompatibles con el crecimiento de los melanocitos (Wellbrock and Marais, 2005).

### **4.4. Síndromes asociados a las mutaciones en MITF**

El síndrome de Waardenburg (WS), descubierto en 1951 por el oftalmólogo P.J. Waardenburg (Tagra et al., 2006), es una enfermedad que cursa con hipopigmentación en pelo, piel e iris y sordera sensoneural. Actualmente, se considera una enfermedad rara, cuya incidencia en la población no supera el ratio de 1/40.000 (Sanchez-Martin et al., 2002). Se hereda de forma autosómica dominante, y se clasifica en cuatro subtipos distintos (I al IV), atendiendo a la presencia o ausencia de síntomas adicionales. Cabe destacar, que la mayoría de los genes asociados al WS, están directamente relacionados con la regulación de la expresión y función de MITF. Así, en humanos, mutaciones en el factor MITF-M son el principal desencadenante del WS II (Tassabehji et al., 1994), cuyo principal



síntoma es la alteración auditiva sensoneural, debido en gran parte, a la falta de maduración de los melanocitos (Price and Fisher, 2001). Por otra parte, WS I y III, son causados por mutaciones en *PAX3*, un modulador directo del promotor de MITF-M, lo que provoca su pérdida de expresión (Lang et al., 2005; Tassabehji et al., 1992; Watanabe et al., 1998). Debido a que *PAX3* afecta también a otros linajes celulares además de los melanocitos, los pacientes con WS tipo I y III, manifiestan otras anormalidades que no siempre tienen que ver con la maduración de los melanocitos. WS IV, es debido fundamentalmente, a mutaciones en el receptor de la endotelina 3, EDNRB, y a mutaciones en el factor de transcripción SOX10, otro modulador positivo de MITF-M (Bondurand et al., 2000; Lee et al., 2000; Verastegui et al., 2000b). No obstante, en el caso de la endotelina, aun no se ha establecido la relación directa con la regulación del factor MITF-M y podría ser debido a un mecanismo indirecto de fosforilación a través de la activación de MAPKs (Fig.6) (Hemesath et al., 1998; Weilbaecher et al., 2001).

Otros estudios, han implicado a Slug, ya que se trata de una diana génica de MITF-M, en la diferenciación y maduración de los melanocitos durante el desarrollo embrionario (Perez-Losada et al., 2002). Algunos pacientes con WS muestran delecciones en ambos alelos de Slug, definiendo así un nuevo grupo de pacientes con WS tipo II (Sanchez-Martin et al., 2002).

#### **4.5. MITF durante la progresión tumoral. Implicación de MITF-M en melanoma**

Durante los últimos años, varios estudios han puesto de manifiesto que MITF-M actúa como oncogén en el melanoma humano. En un 10-20% de los casos analizados, la región del cromosoma 3 que incluye el locus de MITF, fue encontrado amplificado, con una alta incidencia entre los melanomas metastáticos más avanzados y asociado con una disminución en la esperanza de vida del paciente (Garraway et al., 2005b). Sin embargo, la expresión de MITF-M en melanomas, no siempre es igual y depende de la serie tumoral analizada (Miller et al., 2004; Steingrimsson et al., 2004).

El análisis de la expresión de varios genes diana de MITF-M en melanocitos y líneas tumorales derivadas (como *TRPM1*, o los promotores de *TYR*, *TYRP1* y *DCT*), sugieren que la expresión/actividad de MITF-M disminuye con la progresión del melanoma, excepto en los casos en donde el gen de *MITF* se encuentra amplificado (Salti et al., 2000; Selzer et al., 2002). No obstante, MITF-M se ha planteado como una herramienta de potencial utilidad en el diagnóstico de determinados tipos de melanomas (Granter et al., 2002; Granter et al., 2001; King et al., 1999).



## ***OBJETIVOS***



Uno de los objetivos globales del laboratorio es el estudio de los mecanismos y genes implicados en los procesos de TEM, inducidos por los factores de la familia de Snail y bHLH. En base a los resultados previos, obtenidos mediante análisis comparativo de expresión génica en células MDCK con expresión estable de Snail, Slug y E47, donde se encontró reprimida la expresión del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), nos planteamos los siguientes objetivos para el desarrollo de esta tesis:

1. Caracterización de la expresión de MITF y análisis de la isoforma reprimida en el modelo MDCK y líneas tumorales humanas.
2. Efecto del factor MITF-H en la regulación de la expresión de cadherina-E.
3. Efecto de MITF-H en la regulación de los factores Snail y E47.
4. Efecto de la expresión estable de MITF-H en las líneas celulares desdiferenciadas MDCK-E47 y de carcinoma de mama MDA-MB435.



## ***MATERIALES Y MÉTODOS***





## 1. Construcciones de DNA

### 1.1. Vectores de expresión

Para la generación de la construcción pEGFPC1-MITFH, se amplificó el cDNA de MITF-H mediante PCR, utilizando como molde el cDNA de la línea celular humana MCF-7 y los cebadores específicos: directo, 5'- AAAGGAATTCGGAGGCGCTTAGA-3' y reverso, 5'- TTCGGGTACCCTAACAAAGTGTG-3', portadores de dianas para las enzimas de restricción EcoRI/KpnI (subrayadas), clonándose posteriormente en el plásmido pEGFPC1. La construcción pEGFPC1-MITFH porta la secuencia completa del cDNA de MITF-H de humano, fusionada en el extremo N-terminal a la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) en fase. Una vez obtenido el plásmido pEGFPC1-MITFH, mediante el corte con las enzimas NheI/KpnI, separamos la secuencia EGFPC1-MITFH, para su posterior clonaje en el vector pZeo(-)SV2, generando la construcción pZeo(-)SV2-EGFPC1-MITFH. Todas las construcciones fueron verificadas mediante secuenciación. La amplificación del cDNA se realizó con la enzima *High Fidelity Expand System* (Roche) utilizando 30 ciclos de amplificación: 95°C 30 seg, 58°C 1 min, 72°C 2 min 30 seg.

Los vectores de expresión eucariotas (pcDNA3) para los factores Snail, Slug, E47 y E2-2A de ratón, han sido previamente descritos: *Snail* (Cano et al., 2000), *Slug* (Bolos et al., 2003), *E47* (Perez-Moreno et al., 2001) y *E2-2A* (Sobrado, V., Cano, A. y col., en preparación). El vector de expresión pcDNA3-E47-Flag humano fue cedido por laboratorio del Dr. Miyazono (Facultad de Medicina, Universidad Tokio, Japón).

### 1.2. Plásmidos reporteros

Los plásmidos reporteros contienen el cDNA de un gen testigo, bajo el control de una determinada secuencia de DNA del gen cuya actividad promotora se pretende estudiar. Los plásmidos reporteros utilizados en esta memoria contienen el gen testigo *Luciferasa* bajo el control de los siguientes fragmentos de DNA:

**1. Promotor de MITF-H:** **a)** un fragmento de 2,2Kb (de -2151 a +48) de la región promotora de MITF-H (amplificado mediante PCR utilizando como molde DNA genómico de la línea humana HL-60); **b)** dos variantes del promotor de MITF-H (2,2Kb) con mutaciones en las cajas E1 (-2064, CAGGTG → CATTTG) y E2 (-1196, CATCTG → CAATG) independientes; **2. Promotor de MITF-M:** 1,7Kb del promotor (-1796 a -95 con respecto al ATG) (amplificado mediante PCR utilizando como molde DNA genómico de ratón); **3. Promotor de Snail humano:** **a)** ~1,7Kb (de -1637 a +129, con respecto al inicio de transcripción), clonado por el Dr. Renart (Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM), **b)** ~1,4Kb (de -1280 a +129), **c)** ~0,78Kb (de -648 a +129) del promotor de Snail, amplificados y clonados utilizando como molde la construcción de 1,7Kb del promotor de Snail

humano y **d**) dos variantes del promotor de Snail humano (~1,7Kb) con mutaciones en las cajas E1 (-724, CACGTG → CA**A**ATG) y E2 (-614, CACGTG → CA**A**ATG) independientes. Los detalles del clonaje y la descripción de los cebadores utilizados para la generación de los diferentes promotores se describen en la Tabla 2.

La construcción del promotor de *CDHI* humano (de -308 a +21), así como las construcciones con mutaciones en la caja E1 (CAGGTG → CA**G**ATG), E3 (CACCTG → CA**T**CTG) y en ambas cajas simultáneamente del promotor, fusionadas al gen testigo *Luciferasa*, fueron cedidas por el Dr. Van Roy (Universidad de Ghent, Bélgica). Las construcciones del promotor de E2A de ratón de 2,3Kb (de -2994 a +62) y de 0,4Kb (de -382 a +62) que dirigen la expresión de E47, fueron cedidas por el laboratorio del Dr. Mizuguchi (Facultad de Medicina, Universidad de Tokio, Japón).

## **2. Líneas celulares**

En esta tesis se ha usado la línea celular epitelial MDCK-II (*Madin Darby Canine Kidney*) (derivada de epitelio simple de riñón de perro), y varios clones individuales de las células MDCK-CMV, MDCK-E47, MDCK-Snail y MDCK-Slug, obtenidos de la transfección estable de los plásmidos pcDNA3 vacío, pcDNA3-E47, pcDNA3-Snail y pcDNA3-Slug (todos ellos de ratón) respectivamente, en dicha línea celular (Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). A no ser que se indique lo contrario, los clones empleados fueron MDCK-CMV-A2, MDCK-E47-B1, MDCK-Snail-B1 y MDCK-Slug-NC3, respectivamente. También se han utilizado las líneas celulares humanas MCF-7 (carcinoma de mama bien diferenciado), MDA-MB-231, MDA-MB-435S (carcinomas de mama dediferenciados y altamente invasivos) y A375P (melanoma), todas ellas proporcionadas por la Dra. A. Fabra (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (Idibell), L'Hospitalet de Llobregat, España). Las características tumorogénicas, invasivas y metastásicas de dichas células han sido descritas previamente (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Las líneas MDA-MB231ΔSnag (clones 14 y 15) fueron derivadas en nuestro laboratorio por el Dr. Peinado mediante la transfección estable del vector de expresión pcDNA3-ΔSnag (dominante negativo del factor Snail) (resultados no publicados).

## **3. Anticuerpos**

Los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta memoria, así como su origen, procedencia y las diluciones utilizadas en las diferentes aplicaciones en las que se han empleado se describen en la Tabla 3.

**Tabla 2. Plásmidos reporteros utilizados**

Promotor clonado	Cebadores	Enzimas	Vector utilizado
MITF-H (2,2Kb) (-2151 a +48)	Directo 5' <u>CTCGAG</u> CATCAGAGACAATGCTGAA 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> AGGTGTTCTGCAAGCCCT 3'	XhoI / KpnI	pXPI
MITF-H (2,2Kb) (-2151 a +48)  Mutación caja E1 (-2064)	La mutación fue introducida con los cebadores: Directo 5' CTCCTTTCT <b>CATTG</b> AAAGAACTGG 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> AGGTGTTCTGCAAGCCCT 3' El producto de la 1ª PCR se amplificó con los cebadores: Directo 5' <u>CTCGAG</u> CATCAGAGACAATGCTGAA 3' Reverso 5' AGTTCCTT <b>CAATG</b> AGAAAGGAGAA 3' El producto de las dos PCR se amplificó con los cebadores: Directo 5' <u>CTCGAG</u> CATCAGAGACAATGCTGAA 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> AGGTGTTCTGCAAGCCCT 3'	XhoI / KpnI	pXPI
MITF-H (2,2Kb) (-2151 a +48)  Mutación caja E2 (-1196)	La mutación fue introducida con los cebadores: Directo 5' CTTTGC <b>AAATG</b> CCCTTCCC 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> AGGTGTTCTGCAAGCCCT 3' El producto de la 1ª PCR se amplificó con los cebadores: Directo 5' <u>CTCGAG</u> CATCAGAGACAATGCTGAA 3' Reverso 5' GGGAAAGGG <b>CATTG</b> TGCAAAG 3' El producto de las dos PCR se amplificó con los cebadores: Directo 5' <u>CTCGAG</u> CATCAGAGACAATGCTGAA 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> AGGTGTTCTGCAAGCCCT 3'	XhoI / KpnI	pXPI
MITF-M (~1,7Kb) (-1796 a -95)	Directo 5' <u>CTCGAG</u> CTGTTTTTGTGGGACAGTCA 3' Reverso 5' <u>GGGTACC</u> GCATAAAGAAGGCACCATAAA 3'	XhoI / KpnI	pXPI
Snail (~1,7Kb) (-1637 a +129)	Directo 5' <u>CTCGAG</u> AGCTAAATTGACACGGGACGG 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> TCGCCGATTCGCGCAGCAGT 3'	XhoI / KpnI	pGL2
Snail (~1,4Kb) (-1280 a +129)	Directo 5' <u>CTCGAG</u> CAGTCAGGGCCCTATGGA 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> TCGCCGATTCGCGCAGCAGT 3'	XhoI / KpnI	pGL2
Snail (~0,78Kb) (-648 a +129)	Directo 5' <u>CTCGAG</u> CAAAAAGGCCGTGGCATT 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> TCGCCGATTCGCGCAGCAGT 3'	XhoI / KpnI	pGL2
Snail (~1,7Kb) (-1637 a +129)  Mutación caja E1 (-724)	La mutación fue introducida con los cebadores: Directo 5' CAGTGCCCCA <b>CAATG</b> GCTGGGCG 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> TCGCCGATTCGCGCAGCAGT 3' El producto de la 1ª PCR se amplificó con los cebadores: Directo 5' <u>CTCGAG</u> AGCTAAATTGACACGGGACGG 3' Reverso 5' CGCCCAG <b>CATTG</b> TGGGGCACTGT 3' El producto de las dos PCR se amplificó con los cebadores: Directo 5' <u>CTCGAG</u> AGCTAAATTGACACGGGACGG 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> TCGCCGATTCGCGCAGCAGT 3'	XhoI / KpnI	pGL2
Snail (~1,7Kb) (-1637 a +129)  Mutación caja E2 (-614)	La mutación fue introducida con los cebadores: Directo 5' GCCGAGAG <b>CAATG</b> CGGTGT 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> TCGCCGATTCGCGCAGCAGT 3' El producto de la 1ª PCR se amplificó con los cebadores: Directo 5' <u>CTCGAG</u> AGCTAAATTGACACGGGACGG 3' Reverso 5' ACACCG <b>CATTG</b> GCTCTCGGC 3' El producto de las dos PCR se amplificó con los cebadores: Directo 5' <u>CTCGAG</u> AGCTAAATTGACACGGGACGG 3' Reverso 5' <u>GGTACC</u> TCGCCGATTCGCGCAGCAGT 3'	XhoI / KpnI	pGL2

El color rojo indica la mutación introducida con el cebador. Las dianas de las enzimas de restricción se indican subrayadas en los cebadores correspondientes.

**Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados**

Anticuerpos primarios	Especie	WB	IF <sup>(1)</sup>	ChIP	IHQ	Procedencia
Anti-Cadherina-E (ECCD-2)	Rata (Mab)	1:100	1:50 (M)	-	-	M. Takeichi, Universidad de Kyoto, Japón
Anti-Cadherina-E (36)	Ratón (Mab)	1:4000	-	-	1:100	BD Transduction Laboratories
Anti-Cadherina-N (3B9)	Ratón (Mab)	1:200	1:500 (M)	-	-	Zymed Laboratories
Anti-Fibronectina	Conejo (Pb)	1:1000	1:200 (F)	-	-	CHEMICON International
Anti-β-Catenina (14)	Ratón (Mab)	1:500	1:200 (M)	-	-	BD Transduction Laboratories
Anti-γ-Catenina (plakoglobina) (15)	Ratón (Mab)	1:500	1:200 (M)	-	-	BD Transduction Laboratories
Anti-α-Tubulina (DM1A)	Ratón (Mab)	1:10000	-	-	-	Sigma-Aldrich
Anti-EGFP	Conejo (Pb)	1:5000	-	2μg	-	Sigma-Aldrich
Anti-EGFP	Conejo (Pb)	-	1:100 (F)	-	-	Molecular Probes
Anti-Snail (173CE2)	Ratón (Mab)	1:40	-	-	-	I. Virtanen, Universidad de Helsinki, Finlandia
Anti-Flag	Ratón (Mab)	-	-	2μg	-	Sigma-Aldrich
Anticuerpos secundarios	Especie	WB	IF	ChIP	IHQ	Procedencia
Anti-Conejo-HRP	Cabra (Mab)	1:4000	-	-	-	Nordic
Anti-Ratón-HRP	Oveja (Pb)	1:1000	-	-	-	Amersham
Anti-Rata-HRP	Cabra (Mab)	1:10000	-	-	-	Nordic
Anti-rata/ratón/conejo Alexa 488	Cabra (Mab)	-	1:400	-	-	Molecular Probes

(1) Se indica el método de fijación empleado en cada caso, M (metanol) y F (formaldehído).

WB= Western blot; IF= Inmunofluorescencia; IHQ= Inmunohistoquímica . Mab= monoclonal; Pb= policlonal

#### **4. Cultivos celulares**

La mayoría de las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (Gibco BRL) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 µg/ml de ampicilina, 32 µg/ml de gentamicina y 2,5 µg/ml de fungizona, a excepción de las células A375P que se cultivaron en HAM's/DMEM (1:1) (Gibco BRL) suplementado de igual manera. Todas las líneas celulares se crecieron a 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub>. Las micrografías de células en cultivo con contraste de fase se tomaron con una cámara digital Nikon DS-L1 acoplada a un microscopio Nikon TS-100.

#### **5. Transfecciones transitorias y estables de líneas celulares**

Todas las transfecciones se realizaron utilizando el reactivo *Lipofectamine* y *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante.

##### **5.1. Transfecciones transitorias**

Para los ensayos de actividad promotora se sembraron  $1-2,5 \times 10^4$  células/pocillo de las diferentes líneas celulares, en placas de 24 pocillos (Falcon). Al día siguiente, se transfectaron con 400 ng de las distintas construcciones del promotor de MITF-H o 200 ng de las construcciones del promotor de *CDH1*, o de las diferentes construcciones de los promotores de *Snail*, y *E2A*, según se indique en cada apartado de los resultados de esta memoria, y 10 ng del plásmido pCMV-βGal como control de la eficiencia de transfección. Los ensayos de co-transfección se realizaron en presencia de las cantidades indicadas, en cada caso, de los vectores de expresión pcDNA3-Snail, pcDNA3-Slug, pcDNA3-E47, pcDNA3-E2-2A y pEGFPC1-MITFH. La cantidad de DNA total transfectado en todos los puntos de un experimento se igualó con los plásmidos pcDNA3 o pEGFP-C1 vacíos. Transcurridas 24 h se realizaron los ensayos de actividad promotora como se describe en el apartado 6.

##### **5.2. Transfecciones estables**

Los vectores pZeo(-)SV2 y pZeo(-)SV2EGFP-MITFH, fueron transfectados en las células MDCK-II, (MDCK-Snail, -Slug, -E47) resistentes a G418, pero no a zeocina (resistencia proporcionada por el vector pZeo(-)SV2). Por otra parte, los vectores pEGFPC1 y pEGFPC1-MITF-H fueron transfectados en las células MDA-MB435 y A375P (no resistentes a G418, resistencia proporcionada por el vector pEGFPC1). Para ello se sembraron  $3,5 \times 10^5$  células en placas de 60 mm (Falcon) y se transfectaron al día siguiente con 3 µg de cada vector. La selección se realizó con 800 µg/ml de G418 (Calbiochen) en las transfecciones con el vector pEGFPC1, o 500 µg/ml de zeocina (Invitrogen), en las transfecciones con pZeo(-)SV2, iniciándose 24 h después de la transfección y manteniéndose durante un período de 3-4 semanas. 6-10 clones individuales resistentes a los antibióticos, se aislaron, para cada

una de las transfecciones, mediante cilindros de clonaje y posterior crecimiento selectivo en presencia de antibióticos.

## **6. Ensayos de actividad promotora**

La actividad de los promotores de *MITF-H*, *CDH1*, *Snail* y *E2A* se determinó en ensayos de transfección transitoria (apartado 5.1). Transcurridas 24 h de la transfección, las células se lavaron con tampón fosfato salino PBS 1x y se lisaron durante 15 min a temperatura ambiente con tampón de lisis pasivo (Promega). Las actividades luciferasa y  $\beta$ -Galactosidasa de los extractos resultantes, se determinaron con el kit *Dual-Luciferase Reporter assay* y *Beta-Glo Assay System* (Promega) utilizando un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies). La actividad relativa luciferasa/ $\beta$ Gal se normalizó para la actividad detectada en las células control transfectadas con el vector vacío (ensayos de cotransfección) o bien en células establemente transfectadas con el vector pcDNA3 (CMV). Todos los ensayos se realizaron en muestras por triplicado para cada punto del experimento, realizándose al menos tres experimentos de cada condición analizada. Los resultados muestran la media  $\pm$  la desviación estándar de cada experimento.

## **7. Análisis de mRNA**

### **7.1. Extracción de RNA total**

La extracción de RNA total de las distintas líneas celulares se realizó mediante dos técnicas: **a)** con solución D (4M tiocianato de guanidinio; 25 mM citrato sódico pH 7,0; 0.5% sarcosina y 0.1 M  $\beta$ -mercaptoetanol), y purificación mediante fenol-cloroformo para su posterior precipitación con etanol – DEPC; **b)** Trizol (Gibco, BRL) según las indicaciones del fabricante. La cantidad y calidad del RNA obtenido se evaluó mediante geles de agarosa/formaldehído.

### **7.2. Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa**

Para la síntesis del cDNA se retrotranscribieron 2  $\mu$ g de RNA total con la enzima MLV-RT (Promega, Madison WI), utilizando un oligo-dT como cebador, durante 2 h a 37°C. En la Tabla 4 se indican las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar fragmentos de los cDNAs de las distintas isoformas de MITF, cadherina-E, Snail, Slug y E47 de ratón, perro y humano, así como las condiciones empleadas para la amplificación. El cDNA del enzima gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se amplificó conjuntamente con cada condición como control de carga. La comparación de secuencias entre los genes murinos, humanos y canino de MITF, indicó una alta homología entre las especies, de ahí la utilización de cebadores murinos para la amplificación del cDNA de las isoformas de MITF humanas y caninas.

**Tabla 4. Cebadores para el análisis génico por RT-PCR**

RT-PCR	Cebadores	Condiciones	Producto	Enzima <sup>3</sup>
MITF exón2	Directo 5'GTGCAGACCCACCTGGAAAAC 3' Reverso 5'AGTTAAGAGTGAGCATAGCCATAG 3'	35-40 ciclos: 94° 1min, 55° 2min y 72° 2min (5%DMSO)	231pb	Gold
MITF-A ratón <sup>1</sup>	Directo 5'GCGGGCTGAGTGGGGCACTG 3' Reverso 5'AGTTAAGAGTGAGCATAGCCATAG 3'	35-40 ciclos: 94° 1min, 55° 2min y 72° 2min (5%DMSO)	686pb	Gold
MITF-B ratón <sup>1</sup>	Directo 5'TATGCATTTTGGTTTTCCCA 3' Reverso 5'AGTTAAGAGTGAGCATAGCCATAG 3'	35-40 ciclos: 94° 1min, 57° 2min y 72° 2min (5%DMSO)	484pb	Gold
MITF-D ratón <sup>1</sup>	Directo 5'GTTGGGACCTGACAGGCTCTGAATA 3' Reverso 5'AGTTAAGAGTGAGCATAGCCATAG 3'	35-40 ciclos: 94° 1min, 57° 2min y 72° 2min (5%DMSO)	336pb	Gold
MITF-E ratón <sup>1</sup>	Directo 5'TGAAGGTGTAGCAGAGTCC 3' Reverso 5'AGTTAAGAGTGAGCATAGCCATAG 3'	35-40 ciclos: 94° 1min, 54° 2min y 72° 2min (5%DMSO)	628pb	Gold
MITF-H ratón <sup>1</sup>	Directo 5'GAG AACACCTTAAAGGAAGAAAG 3' Reverso 5'AGTTAAGAGTGAGCATAGCCATAG 3'	35-40 ciclos: 94° 1min, 54° 2min y 72° 2min (5%DMSO)	540pb	Gold
MITF-M ratón <sup>1</sup>	Directo 5'ATGCTGGAAATGCTAGAATACAG 3' Reverso 5'AGTTAAGAGTGAGCATAGCCATAG 3'	35-40 ciclos: 94° 1min, 57° 2min y 72° 2min (5%DMSO)	244pb	Gold
Cadherina-E perro	Directo 5'GGAATCCTTGAGGGATCCTC 3' Reverso 5'GTCGTCCTGCCACCGCCGTACAT 3'	35 ciclos: 94° 1min, 60° 1min y 72° 2min	550pb	Gold
Cadherina-E humana	Directo 5'CAAGCTATCCTTGACCTCAG 3' Reverso 5'GCATCAGAGAACTCTATCTTG 3'	30 ciclos: 94° 1min, 60° 1min y 72° 2min	560pb	HF
Snail perro	Directo 5'CCCAAGCCCAGCCGATGAG 3' Reverso 5'CTTGGCCACGGAGAGCCC 3'	35 ciclos: 94° 1min, 65° 1min y 72° 2min	250pb	Gold
E47 ratón	Directo 5'GTACAGATGAGGTGCTGTCCCT 3' Reverso 5'GACACCTTCTCCTCCTCCCTC 3'	30 ciclos: 94° 1min, 60° 1min y 72° 2min	300pb	Gold
E47 de humano y perro <sup>2</sup>	Directo 5'GAGGAGAAAGACCTGAGGGACC 3' Reverso 5'ACCTGACACCTTTTCTCTTCTC 3'	30 ciclos: 94° 1min, 65° 1min y 72° 2min	300pb	HF
Slug humano	Directo 5'CGCTCCTTCTGGTCAAGA 3' Reverso 5'TTGCGTCACTCAGTGTGC 3'	30 ciclos: 94° 1min, 60° 1min y 72° 2min	800pb	HF
Slug perro	Directo 5'AGTGATTATTTCCCATATCTCTATGA3' Reverso 5'GTAGTCTTCTCCTTCATCACTAATGG 3'	30 ciclos: 94° 1min, 60° 1min y 72° 2min	250pb	Gold
EGFP- MITFH	Directo 5'CGGCATGGACGAGCTGTACAAGT 3' Reverso 5'GATCAATCAAGTTTCCCAGACAG 3'	30 ciclos: 95° 1min, 57,5° 2 min y 72° 2 min (5%DMSO)	800pb	HF
GAPDH	Directo 5'TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTGGC 3' Reverso 5'CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC 3'	25-30 ciclos: 94° 1min, 60°-65° 1min y 72° 2min	900pb	Gold/ HF

(1) La comparación de secuencias entre los genes murinos, humanos y caninos indica la conservación de los cebadores seleccionados. (2) La secuencia canina únicamente difiere en un pb del cebador reverso, por lo que es reconocida por los cebadores humanos. (3) Enzimas empleadas: HF=*Expand High Fidelity* (Roche) ; Gold= *Taq Gold* (Perkin Elmer).

El cDNA para las RT-PCR cuantitativas fue sintetizado usando *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) y realizado en el equipo *7900HT Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) (Servicio de Secuenciación, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM). Los cebadores utilizados para la amplificación de Snail humano fueron: directo 5' CACTATGCCGCGCTCTTC 3' y reverso 5' GGTCGTAGGGCTGCTGGAA 3'.

Las densitometrías para la cuantificación de los niveles relativos de mRNA mostradas en esta memoria, se realizaron con el programa informático *Scion Image* (Scion Corporation). Los valores se normalizaron con respecto a los niveles obtenidos en la RT-PCR de GAPDH.

## **8. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

Para investigar la interacción *in vivo* de los factores E47-Flag (expresado a partir del vector pcDNA3-E47-Flag) y EGFP-MITFH (expresado a partir del vector pEGFPC1-MITFH) a los promotores humanos de MITF-H y de Snail, respectivamente, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) convencionales (Fournier et al., 2002). Las proteínas asociadas al DNA se entrecruzaron añadiendo formaldehído al 1% directamente al medio de cultivo e incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lisaron las células en tampón de lisis SDS (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,1) y se sonicaron los lisados para romper el DNA en fragmentos de 200-1000 pb. La fracción de DNA sonicada se sometió a inmunoprecipitación con anticuerpos contra Flag (Tabla 3), para el caso de E47-Flag, y con anticuerpos contra EGFP (Tabla 3), para el caso de EGFP-MITFH, recogiendo la fracción inmunoprecipitada. Como control de ambos experimentos se utilizó las células con expresión del vector vacío.

Las fracciones inmunoprecipitadas (*Bound*) se trataron durante toda la noche con NaCl 5M y a 65 °C, para disociar los complejos proteína-DNA. Posteriormente, se amplificaron mediante PCR varias regiones del promotor de MITF-H y/o del promotor de Snail, usando como templado el DNA de las fracciones inmunoprecipitadas. Se amplificaron fragmentos de ~150-300 pb de ambos promotores utilizando los cebadores y las condiciones indicadas en la Tabla 5. En todos los casos la enzima utilizada fue Red Extract-N-Amp (Sigma Aldrich). El DNA amplificado se visualizó con bromuro de etidio en geles de agarosa al 2,5%. La sensibilidad de la amplificación por PCR fue evaluada con diluciones seriadas del DNA total recogido después de la sonicación (*Input*).

## **9. Análisis de proteínas**

### **9.1. Inmunotransferencia (Western Blot)**

Los extractos totales se prepararon lisando las células en tampón de lisis RIPA (SDS 0,1%, deoxicolato sódico 0,5%, NP-40 1%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0) suplementado con



inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 2mM; leupeptina 2 µg/ml; aprotinina 20 ng/ml; ortovanadato 1 mM). 30-60 µg de los diferentes extractos se resolvieron en geles desnaturalizantes PAGE-SDS conteniendo 7,5-15% de poliacrilamida, según los casos, y se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore). Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C con solución de bloqueo (BSA 5%, o leche 5%, o BSA 2,5% y leche 2,5% en Tampón Tris Salino TBS 1x, Tween-20 0,1%). Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Después de 3 lavados de 5 min con TBS 1x, Tween-20 0,1%, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 45 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS 1x, Tween-20 0,1%. Todos los anticuerpos utilizados, así como las diluciones empleadas, preparadas en solución de bloqueo al 50% en TBS 1x, quedan recogidos en la Tabla 3. El revelado se realizó por luminiscencia utilizando el reactivo ECL (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos, la imagen mostrada corresponde a un experimento representativo de, al menos, dos realizados.

#### **10. Análisis de inmunofluorescencia**

Las células fueron crecidas sobre cristales de 10-12 mm de diámetro en placas de 60 mm (Falcon), hasta alcanzar un 60-80% de confluencia. Las células fueron fijadas con metanol a -20°C durante 1 min. Alternativamente, para la tinción de algunos anticuerpos determinados (ver Tabla 3), las células se fijaron con formaldehído al 3,7% durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se permeabilizaron con Triton X-100 0,1% (Sigma Aldrich), en PBS 1x durante 15 min. Los cristales se incubaron con los anticuerpos diluidos en PBS 1x durante 1 h a 37°C en atmósfera húmeda. Tras la incubación del anticuerpo primario, los cristales se lavaron con PBS 1x 3 veces durante 10 min a temperatura ambiente y en agitación. La incubación con los anticuerpos secundarios diluidos en PBS 1x se realizó durante 45 min a 37°C en atmósfera húmeda. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, los cristales se lavaron con PBS 1x, Triton X-100 0,1%, 4 veces durante 5 min a temperatura ambiente y en agitación. Todos los anticuerpos utilizados, así como las diluciones empleadas quedan recogidos en la Tabla 3.

Los núcleos de las células se tiñeron mediante incubación con DAPI, 1µg/ml (Sigma Aldrich), durante 5 min a temperatura ambiente. Las preparaciones se montaron en mowiol (Sigma Aldrich) y se visualizaron usando un microscopio Zeiss Axiophot equipado con epifluorescencia acoplado a una cámara digital Olympus DP70.

**Tabla 5. Cebadores utilizados en el ensayo de ChIP**

<b>Región analizada</b>	<b>Cebadores</b>	<b>Condiciones PCR</b>	<b>Producto</b>
Promotor de MITF-H Región de -1334 a -1144	Directo 5'TCTGTTTACCCCAATACCTGGTACAG 3' Reverso 5'TACTGCAATAGTCCTGGTAGGAGGTG 3'	35 ciclos: 94° 1min, 54,5° 1min y 72° 1min	190pb
Promotor de MITF-H Región de -1265 a -917	Directo 5'CTCCACGAATTTACACAATGCCTGG 3' Reverso 5'CTCCCTACACACAATTCAAAGGTCAT 3'	35 ciclos: 94° 1min, 53° 1min y 72° 1min	340pb
Promotor de MITF-H Región de -2165 a -1904	Directo 5'CCTATGGGTAGTCACTTATTTCTCC 3' Reverso 5'GGTACTGTACCAGGTATTGGGGTAA 3'	35 ciclos: 94° 1min, 52° 1min y 72° 1min	252pb
Promotor de Snail Región de -804 a -615	Directo 5'ACTGGACCAGAAGCTACCCTTC 3' Reverso 5'CTCTCGGCGGCTTGAAATGCC 3'	35 ciclos: 94° 1min, 58° 1min y 72° 1min	190pb
Promotor de Snail Región de -635 a -409	Directo 5'GCATTTC AAGCCGCCGAGAG 3' Reverso 5'CTCAGCGCCCGGTGGTCTGA 3'	35 ciclos: 94° 1min, 63° 1min y 72° 1min	225pb
Promotor de Snail Región de -1637 a -1378	Directo 5'CTGATTGGAGCTAAATTGACACGG 3' Reverso 5'TCACAGGTCTCACCGTTCTTGTTC 3'	35 ciclos: 94° 1min, 57° 1min y 72° 1min	259pb

## **11. Análisis del perfil de expresión génica asociado a la expresión de Snail, Slug y E47 en las células MDCK**

El análisis de los programas de expresión génica asociados a los cambios fenotípicos inducidos por la expresión de E47, Snail y Slug en las células MDCK, se llevó a cabo mediante *microarrays* de cDNA, en colaboración con los Drs. J. Palacios, G. Moreno-Bueno y D. Sarrió (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid, España) y han sido recientemente publicados (Moreno-Bueno et al., 2006). La técnica de *microarrays* permite la cuantificación de la expresión de miles de genes a la vez y se basa en la hibridación competitiva de dos muestras diferentes.

## **12. Ensayos de proliferación celular**

Los ensayos de proliferación celular fueron realizados, en ausencia y en presencia de suero, midiendo la incorporación de BrdU durante dos horas, utilizando el kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU* (Roche, Cat. 1-647-229), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

### 13. Ensayos de tumorogenicidad

La capacidad tumorogénica de las líneas celulares MDA-MB435 parental y clones derivados como MDA-MB435 control y MDA-MB435EGFP-MITFH, se analizó mediante inyección ortotópica en la glándula mamaria de ratones hembra nu/nu (Harlan) de seis semanas. Se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en 50  $\mu$ l de medio DMEM sin suero, en la quinta glándula mamaria del lateral derecho, en un total de 6 animales por muestra experimental. Los ratones se inspeccionaron 3 veces/semana, midiendo el tamaño de los tumores con un calibre. El análisis estadístico de los datos mediante el análisis de la varianza de dos vías (*two way ANOVA*) se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism v3.0*. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 0,8-1  $\text{cm}^3$  de tamaño, las ratonas fueron sacrificadas. Los tumores se extirparon y se dividieron en tres partes: **a)** una parte se embebió en OCT (*Tissue-Tek, Sakura*) y fue congelada en nitrógeno líquido para su posterior análisis inmunohistoquímico, **b)** otra parte fue fijada con formol al 4% para su análisis patológico por el Servicio de Patología Animal (Facultad de Veterinaria (Universidad Complutense de Madrid)) y **c)** una tercera parte fue congelada directamente en nitrógeno líquido para la posterior extracción de RNA del tumor. En este último caso y previo a la congelación, se eliminó al máximo toda la piel y tejidos adyacentes al tumor con el fin de evitar contaminaciones.

Los experimentos se realizaron siguiendo las directrices del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (*Institucional Animal Care and Use Committee, IACUC*).

### 14. Inmunohistoquímica

Se obtuvieron secciones de 10  $\mu$ m de la fracción de los tumores embebidos en OCT, sobre las que se realizó la inmunohistoquímica de cadherina-E utilizando el método Envision Plus (Dako), siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo de cadherina-E utilizado, así como la dilución empleada queda recogido en la Tabla 3. Posteriormente, las secciones se contrastaron con hematoxilina-eosina, se deshidrataron con gradientes de etanol, se aclararon con xilol y se montaron con Depex (Serva). Secciones paralelas se tiñeron directamente con hematoxilina-eosina siguiendo los protocolos habituales.

Las preparaciones se visualizaron usando un microscopio Zeiss Axiophot acoplado a una cámara digital Olympus DP70.



## ***RESULTADOS***



## 1. Caracterización de la expresión del factor MITF

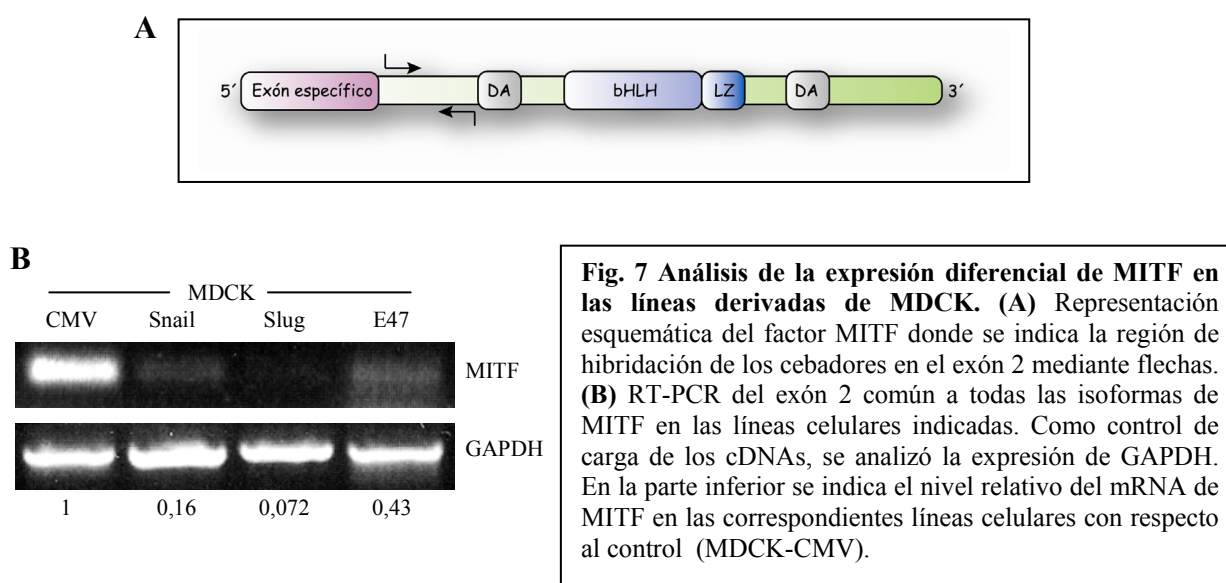
Los factores de transcripción Snail, Slug y E47, han sido descritos en los últimos años como represores directos del gen de cadherina-E e inductores de TEM, en células epiteliales MDCK (Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Sin embargo, aunque la expresión de estos factores ha sido descrita en distintos tipos tumorales (revisado en Peinado et al., 2007), todavía se desconoce si los diferentes represores actúan de forma redundante o específica durante la progresión tumoral. Con el propósito de analizar este aspecto, en el laboratorio se realizó un análisis del patrón de expresión génica mediante *microarrays de cDNAs*, en células MDCK que expresan establemente los represores Snail, Slug y E47, con respecto a las células control. Este análisis permitió identificar un gran número de genes cuya expresión se encuentra alterada de manera común o específicamente, en las tres líneas celulares (Moreno-Bueno et al., 2006). Muchos de estos genes, se han relacionado con diferentes aspectos del cáncer y con procesos de TEM. En la Tabla 6, se muestra una selección de genes implicados en distintas funciones celulares. Entre los genes relacionados con regulación transcripcional, se detectó un gen cuya expresión estaba reprimida en las tres líneas celulares MDCK-Snail, -Slug y -E47, el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF). Este hecho y la implicación del factor MITF en algunos tipos de cáncer como el melanoma (Garraway et al., 2005a; Granter et al., 2002; Granter et al., 2001; King et al., 1999; Miller et al., 2004; Miller and Mihm, 2006; Salti et al., 2000; Selzer et al., 2002; Steingrimsson et al., 2004; Vachtenheim et al., 2001), nos motivó a estudiar la implicación de este factor y su mecanismo de regulación en el modelo celular MDCK.

**Tabla 6. Datos del análisis de *microarrays de cDNA*.** Niveles relativos de expresión de los genes indicados, en las líneas MDCK-Snail, -Slug y -E47, respecto a las células control (MDCK-CMV).

Función	Genes	MDCK Mock	MDCK Snail	MDCK Slug	MDCK E47
Implicados en TEM	Integrina $\beta 1$	1	3,64	-1,08	1,95
	Desmoplakina	1	-5,60	-3,10	-1,60
	Vinculina	1	1,75	3,06	2,44
	Cadherina-E	1	-16,60	-16,60	-16,60
Implicados en regulación transcripcional	MITF	1	-4,3	-2,60	-3,10
	Kreisler/mafB	1	1,7	3,46	11,75
	Twist	1	1,24	3,76	5,02
	TCF4/E2-2	1	2,42	8,77	2,04
Implicados en ciclo celular	CDKN2C	1	1,48	2,9	2,77
	Ciclina D1	1	-2,17	4,43	2,33
Implicados en control de la apoptosis	DAPK1	1	1,87	2,44	2,58
	GAS1	1	1,28	2,12	11,94

### 1.1 Expresión diferencial de MITF en el modelo MDCK

Con el objetivo de validar los datos obtenidos en el análisis de *microarrays*, nos planteamos estudiar la expresión de MITF por RT-PCR, ya que los análisis mediante Northern-Blot no permitían distinguir entre isoformas (datos no mostrados). Para ello, escogimos en primer lugar, cebadores que alineaban con una región del exón 2 común a todas las isoformas de MITF (Ver Materiales y Métodos) (Fig.7A). De esta forma, se pudo validar que la expresión de MITF se encuentra reprimida en células MDCK que expresan de forma estable los factores Snail, Slug y E47 (Fig.7B).

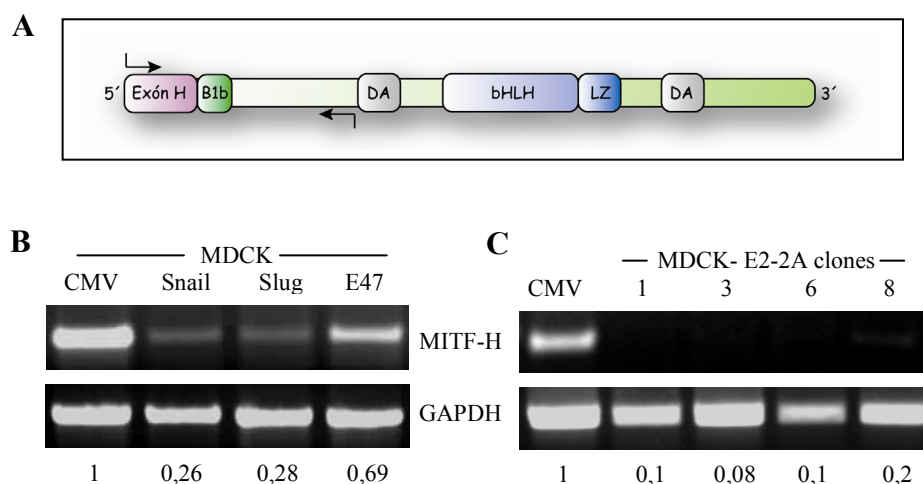


### 1.2. Análisis de la isoforma de MITF expresada en MDCK

Como se ha comentado en la Introducción, estudios previos habían demostrado la existencia de al menos nueve isoformas distintas de MITF (A, B, C, D, E, H, J, M y Mc), diferenciables en el primer exón, entre otros aspectos (Amae et al., 1998; Fuse et al., 1999; Hershey and Fisher, 2005; Hodgkinson et al., 1993; Oboki et al., 2002; Takeda et al., 2002; Takemoto et al., 2002; Tshori et al., 2007; Udonon et al., 2000). Por este motivo, el siguiente paso fue intentar determinar, cual era la isoforma o isoformas que se expresaban en las líneas celulares derivadas de MDCK. Para este propósito, diseñamos distintos cebadores que hibridaban con exones específicos para diferentes isoformas de MITF (Ver Materiales y Métodos) (Fig.8A). Los análisis de RT-PCR indicaron que las células MDCK, expresan la isoforma MITF-H, estando reprimida tras la sobreexpresión estable de los tres factores Snail, Slug y E47 (Fig.8B). Los resultados de las RT-PCR realizadas con cebadores específicos de las demás isoformas, fueron negativos en todos los casos en células MDCK y líneas derivadas (datos no mostrados). Este dato, estaba de acuerdo con el hecho de que el nivel de expresión de la región común de MITF en estas mismas líneas (Fig.7B) fuese similar, lo que apoya que las células MDCK expresen única o mayoritariamente la isoforma MITF-H.



A diferencia de MITF, los análisis de *microarrays* anteriormente mencionados, mostraron que el factor bHLH E2-2/TCF4 se encuentra sobreexpresado en células MDCK-Snail, -Slug y -E47 (Tabla 6, (Moreno-Bueno et al., 2006)). Por ello, se extendió el estudio de expresión del factor MITF-H a células MDCK con expresión estable del factor bHLH E2-2A (una de las dos isoformas de E2-2). Las células MDCK-E2-2A sufren una TEM completa similar a la observada en las células MDCK-Snail, -Slug y -E47 (Sobrado, V., Cano, A. y col., en preparación). El análisis de RT-PCR confirmó los bajos niveles de expresión de MITF-H en varios clones independientes de células MDCK-E2-2A (Fig.8C).



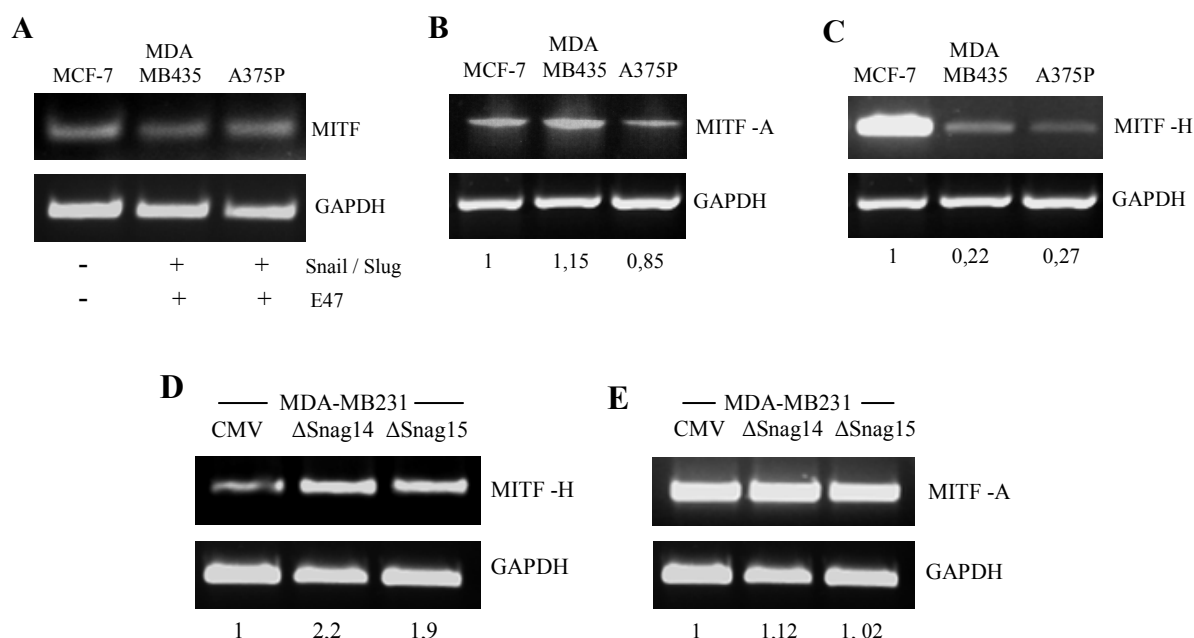
**Fig. 8 Expresión de MITF-H.** (A) Representación esquemática del factor MITF donde se indica la región de hibridación de los cebadores en el exón H y exón 2 mediante flechas. (B) y (C) RT-PCR en las líneas derivadas de MDCK indicadas del exón específico de MITF-H, que amplifica una región de 540pb del factor. Como control de carga de los cDNA, se analizó la expresión de GAPDH. En la parte inferior se indica el nivel relativo del mRNA de MITF-H en las correspondientes líneas celulares, respecto a las células control (MDCK-CMV).

### 1.3. Análisis de la expresión de MITF-H en líneas tumorales humanas

La expresión de MITF se analizó, asimismo, en algunas líneas celulares humanas derivadas de carcinomas de las que se disponía de información acerca de la expresión de los factores Snail, Slug y E47 (Cano et al., 2000; Hajra et al., 2002; Moreno-Bueno et al., 2006; Perez-Moreno et al., 2001) (Fig.9A). Los resultados obtenidos, mostraron un nivel de expresión de la región común de todas las isoformas de MITF similar en las tres líneas analizadas: MCF-7 (carcinoma de mama, bien diferenciado, no invasivo), MDA-MB435 (carcinoma de mama poco diferenciado e invasivo) y A375P (melanoma). A diferencia de lo observado en la línea MDCK, el estudio de las distintas isoformas de MITF por RT-PCR, mostró que las líneas humanas MCF-7, MDA-MB435 y A375P, expresan al menos dos de las isoformas descritas de MITF, la isoforma A y la H. La isoforma A (Fig. 9B), mostró niveles similares de expresión en las tres líneas celulares analizadas. Sin embargo, la expresión de MITF-H se encontró fuertemente reprimida en las líneas más desdiferenciadas, MDA-MB435 y A375P (Fig. 9C),

con expresión endógena de los factores Snail, Slug y E47 (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Hajra et al., 2002; Moreno-Bueno et al., 2006; Perez-Moreno et al., 2001).

Para profundizar en la posible implicación de Snail en la regulación de MITF, extendimos el estudio a la línea de carcinoma de mama MDA-MB231 (altamente invasiva), con expresión endógena de Snail, y a dos clones derivados tras la expresión de un dominante negativo del dominio co-represor SNAG de Snail (Fig.9D,E) ( $\Delta$ Snag14 y  $\Delta$ Snag15) (Peinado, H y Cano, A., datos no publicados). El análisis mediante RT-PCR de las isoformas MITF-A y MITF-H mostró un incremento notable de los niveles de mRNA de MITF-H en las células MDA-MB231 $\Delta$ Snag respecto a las células control (MDA-MB231-CMV) (Fig.9D), mientras que no se observaron cambios en los niveles de mRNA de MITF-A en células MDA-MB231 $\Delta$ Snag respecto a sus controles (Fig. 9E). Estos últimos resultados apoyan la implicación directa o indirecta del represor Snail en la regulación negativa de la isoforma H de MITF, al menos en las células MDA-MB231.

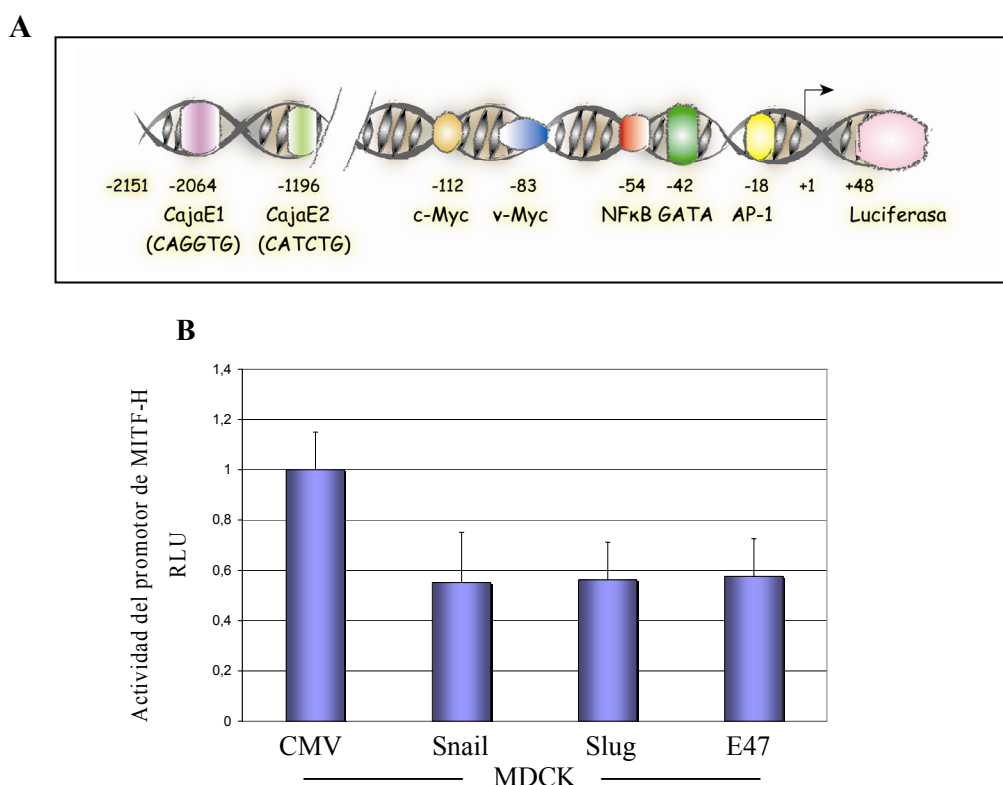


**Fig. 9 Análisis de la expresión diferencial de MITF en líneas humanas tumorales.** (A-C) Las líneas MCF-7, MDA-MB435 y A375P fueron analizadas mediante RT-PCR para la región común de MITF (A), y de las isoformas MITF-A (B) y MITF-H (C), utilizando los cebadores apropiados. (D) y (E) La línea celular MDA-MB231 y sus clones derivados MDA-MB231 $\Delta$ Snag14 y  $\Delta$ Snag15, fueron analizados mediante RT-PCR para las isoformas MITF-H (D) y MITF-A (E), utilizando los cebadores apropiados. Como control de carga de los cDNA, se analizó la expresión de GAPDH. En la parte inferior de cada panel se indica el nivel relativo del mRNA de MITF en las correspondientes líneas celulares con respecto a sus controles (B-E), y la expresión de los factores Snail, Slug y E47 mediante símbolos (+) y (-) (A).

## 2. Análisis del promotor de MITF-H

### 2.1. Efecto de la expresión de los factores Snail, Slug y E47 en la actividad del promotor de MITF-H

Como se ha indicado en la Introducción, el gen humano para MITF, se caracteriza por contener al menos nueve promotores funcionales, alguno de los cuales muestran un cierto grado de especificidad celular (Hershey and Fisher, 2005; Udonon et al., 2000). Con el conocimiento de la isoforma de MITF-H expresada en las células MDCK, y para obtener más información acerca de la regulación transcripcional por los factores Snail, Slug y E47, se clonó una región del promotor humano específico de la isoforma H (-2151/+48) fusionado al gen testigo de la luciferasa (Fig.10A). La actividad del promotor de MITF-H se analizó en ensayos de transfección transitoria en células MDCK-CMV, -Snail, -Slug y -E47. Como se muestra en la Fig.10B, las células MDCK que expresan cualquiera de los tres factores, muestran una represión del promotor de MITF-H (del 50% aproximadamente) respecto a las células control MDCK-CMV. Estos resultados ponen de manifiesto una regulación transcripcional del promotor de MITF-H en este sistema celular.

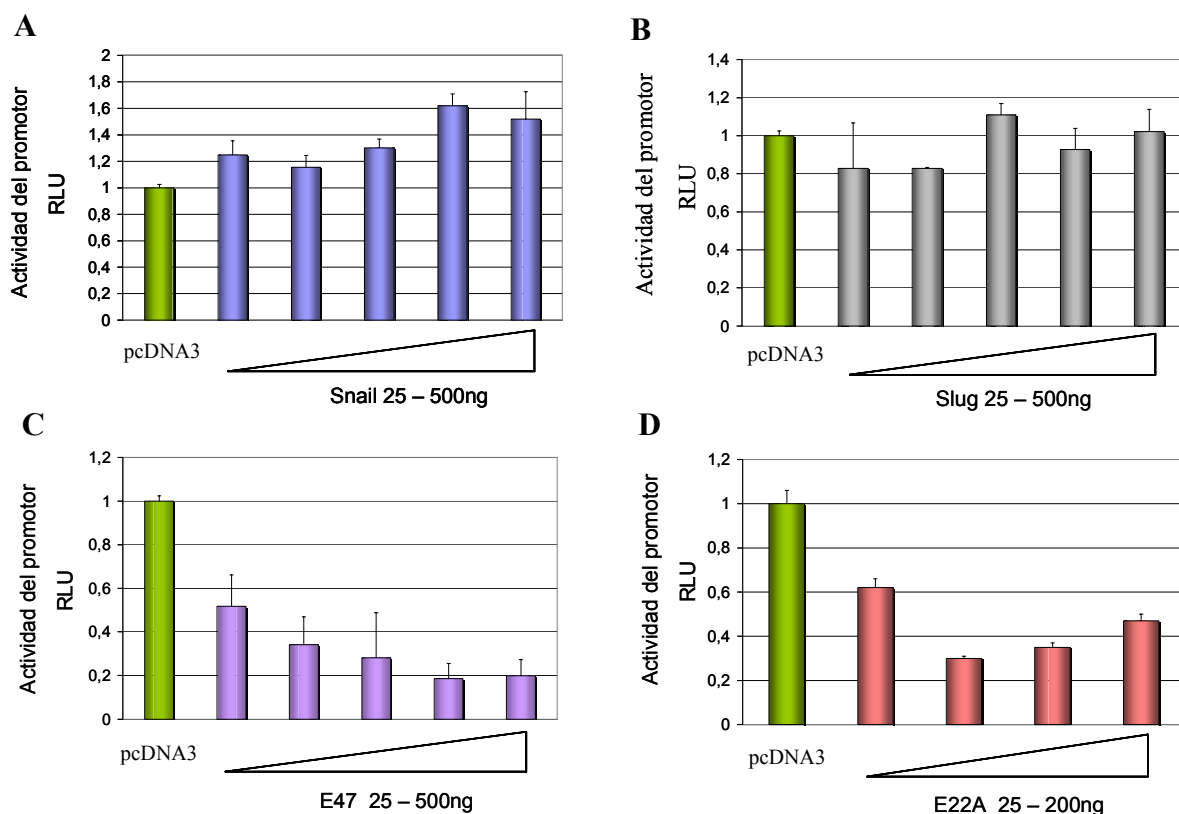


**Fig. 10 Efecto de los factores Snail, Slug y E47 sobre el promotor de MITF-H en MDCK. (A)** Esquema de la región clonada del promotor humano de MITF-H (-2151/+48). Se indica la posición de sitios consenso de unión de distintos factores entre los que destacan dos cajas E (E1 a -2064 y E2 a -1196). **(B)** Actividad del promotor de MITF-H en líneas derivadas de MDCK tras la expresión estable de Snail, Slug y E47. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) del promotor de MITF-H tras su transfección transitoria durante 24 horas. Los valores están normalizados respecto a la actividad detectada en células control (MDCK-CMV). Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, cuatro experimentos independientes.

Estudios similares con el promotor específico de la isoforma MITF-M, mostraron la ausencia de actividad promotora en células MDCK y sus derivados (datos no mostrados).

Con el propósito de conocer, si la regulación negativa observada en el promotor MITF-H en células MDCK-Snail, -Slug y -E47 sucede de forma directa o indirecta, se analizó el efecto de los tres factores en ensayos de cotransfección transitoria sobre células control MDCK (Fig.11A-C). Los resultados mostraron, que los factores Snail (Fig.11A) y Slug (Fig.11B) no son capaces de reprimir directamente al promotor de MITF-H, observándose incluso una moderada activación mediada por Snail. Únicamente en el caso de E47 (Fig.11C), se pudo observar un efecto directo de represión sobre el promotor. Este último dato, nos llevó a buscar otros factores bHLH que pudieran estar implicados en la regulación negativa del promotor. Este fue el caso del factor bHLH E22A que mostró una capacidad de represión directa del promotor MITF-H en células MDCK parentales (Fig.11D), aunque algo menor a la mostrada por E47 (Fig.11C).

Estos resultados sugieren que los factores bHLH, E47 y E22A, son capaces de unirse al promotor de MITF-H directamente en células MDCK, y de provocar su regulación negativa, mientras que la represión observada por la expresión estable de Snail y Slug, en este sistema, podría ser indirecta o estar mediada por secuencias no incluidas en la construcción del promotor de MITF-H utilizada.



**Fig. 11. Efecto de la expresión transitoria de Snail, Slug, E47 y E22A sobre la actividad del promotor MITF-H, en células MDCK.** Actividad del promotor de MITF-H en la línea MDCK tras la transfección transitoria de los factores (A) Snail, (B) Slug, (C) E47 y (D) E22A. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) tras la transfección transitoria de las cantidades indicadas de pcDNA3-Snail, -Slug, -E47, -E22A, con respecto a la actividad obtenida en presencia de 500 (A-C) y 200 (D) ng del vector control vacío. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes para cada una de las condiciones experimentales.

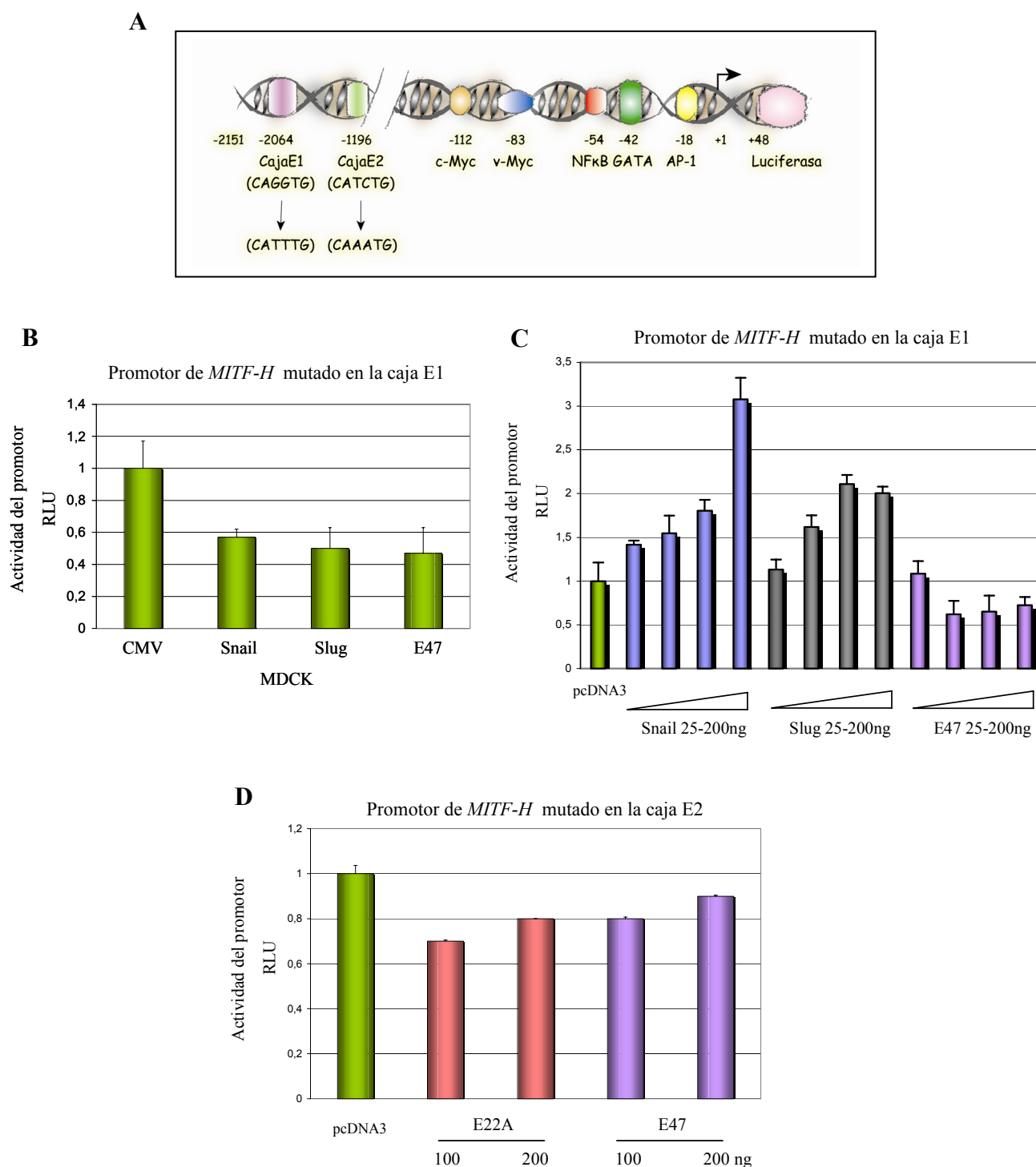
### **2.1.1. Efecto de mutaciones en las cajas E distales del promotor de MITF-H**

En los últimos años, numerosos trabajos han demostrado la interacción de los factores Snail, Slug, E47 y E2-2A/B a secuencias del tipo caja E (Bolos et al., 2003; Ellenberger et al., 1994; Fuse et al., 1994; Hemavathy et al., 2000a; Hemavathy et al., 2000b; Inukai et al., 1999; Kataoka et al., 2000; Mauhin et al., 1993). Con el objeto de profundizar sobre la regulación del promotor humano de MITF-H, decidimos analizar algunas cajas E que presentan mejor homología con la secuencia consenso para los factores mencionados, y estudiar su posible implicación en la represión, directa o indirecta, de dichos factores. El análisis “in silico” de la región del promotor de MITF-H humano clonado, indicó la presencia de varias cajas E, de las cuales analizamos dos (Fig.12A): la caja E1, a -2064 (CAGGTG), por ser una secuencia consenso para factores Snail (Mauhin et al., 1993) y la caja E2, a -1196 (CATCTG), que muestra mayor preferencia para factores bHLH, como E47 y E2-2A (Ellenberger et al., 1994). Para analizar la implicación de ambas cajas E se clonaron construcciones con mutaciones independientes en cada una de ellas. La construcción con la mutación en la caja E1 (-2064) fue transfectada transitoriamente, tanto en células MDCK con expresión estable de Snail, Slug o E47 (Fig.12B), como en células MDCK parentales con expresión transitoria de cada uno de los tres factores (Fig.12C). Los resultados obtenidos indicaron que la caja E1 no estaba implicada en el proceso de represión de promotor de MITF-H, obteniéndose resultados similares a los obtenidos con la construcción sin mutar en ambos tipos de experimentos (comparar Fig.12B con Fig.10B y Fig.12C con Fig.11A, B y C).

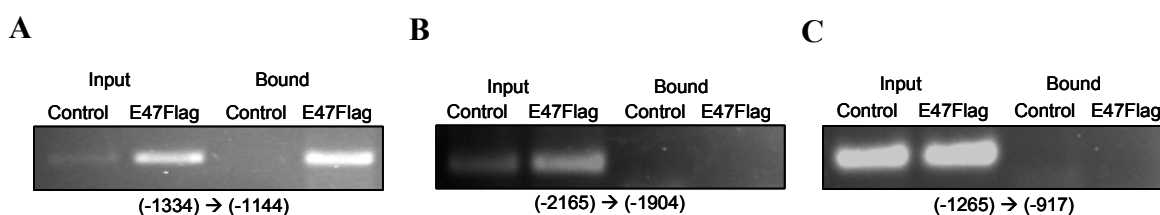
Por el contrario, la construcción con la mutación en la caja E2 (-1196) (Fig.12A) dio lugar a la desrepresión total o parcial de la actividad del promotor de MITF-H ejercida por los factores E47 y E2-2A (Fig. 12D). Estos resultados indicaron la implicación de la caja E2 en la represión del promotor de MITF-H.

### **2.1.2. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)**

Los resultados obtenidos en los ensayos de promotor de MITF-H con la construcción que contenía la mutación en la caja E2 (-1196), nos hizo pensar que probablemente fuese una región reconocida por los factores bHLH E47, o E22A. Para aclarar este punto, nuestro siguiente objetivo fue analizar la posible interacción *in vivo*, de alguno de estos factores sobre esta región del promotor de MITF-H. Para este propósito, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células MDCK con expresión de pcDNA3-E47-Flag y cebadores específicos contra distintas regiones del promotor de MITF-H (Ver Materiales y Métodos). Como se aprecia en la Fig.13, los ensayos de ChIP, muestran la interacción *in vivo* de E47-Flag sobre la región comprendida entre -1334 y -1144, en cuya secuencia se halla la caja E2 (CATCTG) (Fig.13A). Para el resto de regiones analizadas, el resultado fue negativo (Fig.13B y C), descartando la interacción del factor E47 con dichas regiones, incluyendo la caja E1 (-2064) (Fig.13B).



**Fig. 12. Efecto de la mutación de las cajas E1 y E2 del promotor MITF-H, en células MDCK. (A)** Esquema del promotor de MITF-H. Se indica la posición y la mutación introducida en las cajas E1(-2064) y E2 (-1196) de las cajas E mutadas. **(B)** y **(C)** Actividad del promotor mutado en la caja E1 **(B)** en las líneas MDCK-CMV, -Snail, -Slug y -E47 y **(C)** tras la expresión transitoria de las cantidades indicadas de pcDNA3-Snail, -Slug y -E47, en células MDCK parentales. **(D)** Actividad del promotor mutado en la caja E2 en las células MDCK parentales tras la expresión transitoria de las cantidades indicadas de pcDNA3-E22A y -E47. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) con respecto a la presente en células control (MDCK-CMV) **(B)** o tras la transfección con el vector control pcDNA3 **(C)** y **(D)** durante 24h. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes para cada una de las condiciones experimentales.

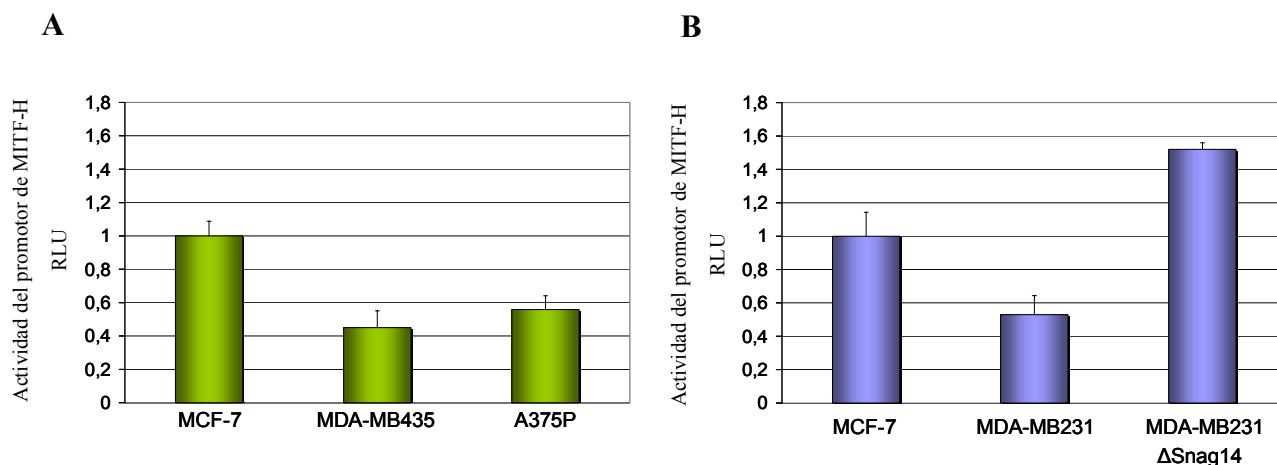


**Fig. 13. Análisis de la interacción *in vivo* del factor E47 con el promotor de MITF-H.** Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina utilizando células MDCK transfectadas transitoriamente con pcDNA3-E47-Flag o con el vector vacío pcDNA3-Flag (Control). Las fracciones de cromatina se inmunoprecipitaron con anticuerpos contra Flag (*Bound*) y tras el procesamiento adecuado, se amplificaron las regiones del promotor de MITF-H indicadas con los cebadores apropiados. Como control se amplificó en paralelo las regiones correspondientes a fracciones de cromatina no unida (*Input*).

En conjunto, estos resultados indican que los factores bHLH E47 y E2-2A son capaces de reprimir de forma directa el promotor de MITF-H, habiéndose caracterizado la participación de la caja E2 (-1196) en la interacción de E47 con el promotor.

## 2.2. Estudio del promotor de MITF-H en distintas líneas tumorales humanas

El análisis del promotor de MITF-H se extendió a las líneas celulares humanas MCF7, MDA-MB 231, MDA-MB231ΔSnag14, MDA-MB435 y A375P, en las que se había observado diferentes niveles de expresión de la isoforma MITF-H (ver Fig.9C y D). Los resultados obtenidos mostraron una represión del promotor de alrededor del 40-50%, en las líneas desdiferenciadas, MDA-MB435, A375P (Fig.14A) y MDA-MB231 (Fig.14B), con respecto a las células MCF7, utilizadas como control. Significativamente las células MDA-MB231 con expresión del dominante negativo de Snail, MDA-MB231ΔSnag14, mostraron una fuerte desrepresión de la actividad del promotor MITF-H (Fig.14B), en concordancia con los datos de RT-PCR obtenidos en este sistema celular (ver Fig.9D), reforzando así la implicación de Snail en la regulación negativa de la expresión de MITF-H.



**Fig. 14 Análisis del promotor de MITF-H en líneas tumorales humanas.** (A) y (B) Actividad relativa del promotor de MITF-H en las líneas humanas indicadas. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) del promotor de MITF-H a las 24 horas de transfección. Los valores se normalizaron en todos los casos a los obtenidos para la línea diferenciada de carcinoma de mama MCF-7 y representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, cuatro experimentos independientes.

### 3. Efecto del factor MITF-H sobre el promotor de *CDH1* humano

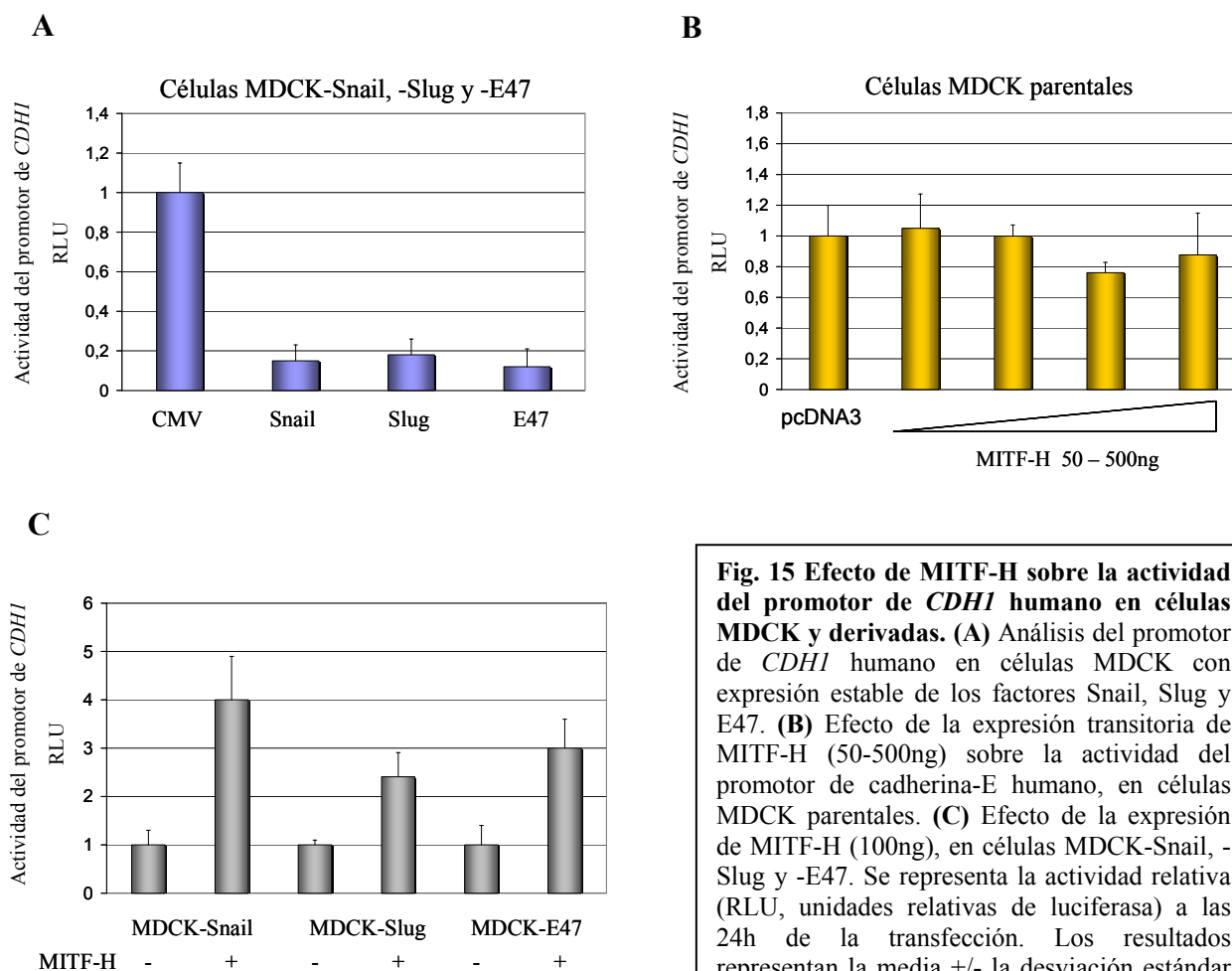
Estudios previos en osteoclastos de ratón, habían puesto de manifiesto la relación directa entre la isoforma M de MITF y cadherina-E, revelando que MITF-M es capaz de activar al promotor de cadherina-E de ratón durante la maduración de los osteoclastos murinos (Mansky et al., 2002a). Por otra parte, recientemente se ha implicado a otros factores de la subfamilia MiT, en la activación del promotor de cadherina-E. En concreto, los factores TFEB y TFE3 se han propuestos como activadores del promotor de cadherina-E, a través de la vía de las MAPK y en respuesta al factor inhibidor de la leucemia o LIF en fibroblastos de ratón (NIH3T3) y en células embrionarias humanas de riñón (HEK293T) (Huan et al., 2005). De hecho, mutaciones en estos genes (*TFEB*, *TFE3*) han sido relacionadas con distintos tipos de cáncer, entre ellos, cáncer renal y sarcoma alveolar (Argani and Ladanyi, 2003). Estos hallazgos, nos impulsaron a conocer si la isoforma H de MITF, pudiese estar implicada también en la regulación del promotor de cadherina-E.

#### 3.1. Estudio del promotor de *CDH1* en el sistema MDCK

Estudios previos de nuestro laboratorio y otros grupos, habían demostrado la capacidad de las células MDCK-Snail, -Slug y -E47 de reprimir el promotor murino de cadherina-E (Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Por este motivo, analizamos en este sistema celular la posible implicación de MITF-H en la regulación del promotor de *CDH1* humano. La fuerte represión del promotor de *CDH1* humano en células MDCK-Snail, -Slug y -E47 fue confirmada en primer lugar



(Fig.15A). Los ensayos de co-transfección transitoria revelaron, que MITF-H no es capaz de regular la actividad del promotor de cadherina-E en células MDCK parentales que muestran una alta actividad basal del promotor (Fig.15B). Sin embargo, MITF-H es capaz de inducir una fuerte activación del promotor de *CDH1* (de 2,5 a 4 veces), en las líneas celulares MDCK-Snail, -Slug y -E47 en las que existe una fuerte represión del promotor de *CDH1* (Fig.15C).



**Fig. 15 Efecto de MITF-H sobre la actividad del promotor de *CDH1* humano en células MDCK y derivadas. (A)** Análisis del promotor de *CDH1* humano en células MDCK con expresión estable de los factores Snail, Slug y E47. **(B)** Efecto de la expresión transitoria de MITF-H (50-500ng) sobre la actividad del promotor de cadherina-E humano, en células MDCK parentales. **(C)** Efecto de la expresión de MITF-H (100ng), en células MDCK-Snail, -Slug y -E47. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) a las 24h de la transfección. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes para cada una de las condiciones experimentales.

El promotor humano de *CDH1*, se caracteriza por tener tres cajas E (Caja E1, 3 y 4)(Fig.16A), descritas como necesarias para la interacción de los represores Snail (Batlle et al., 2000), Slug (Hajra et al., 2002) y ZEB1/ZEB2 (Comijn et al., 2001; Eger et al., 2005). Los estudios previos sobre la acción de MITF-M, así como otros miembros de la subfamilia MiT, habían revelado que la caja E3 del promotor de *CDH1* (conservado en los promotores murino y humano, ver Fig.3), era fundamental para la interacción de estos factores durante la activación del gen de *cadherina-E* (Huan et al., 2005; Mansky et al., 2002a).

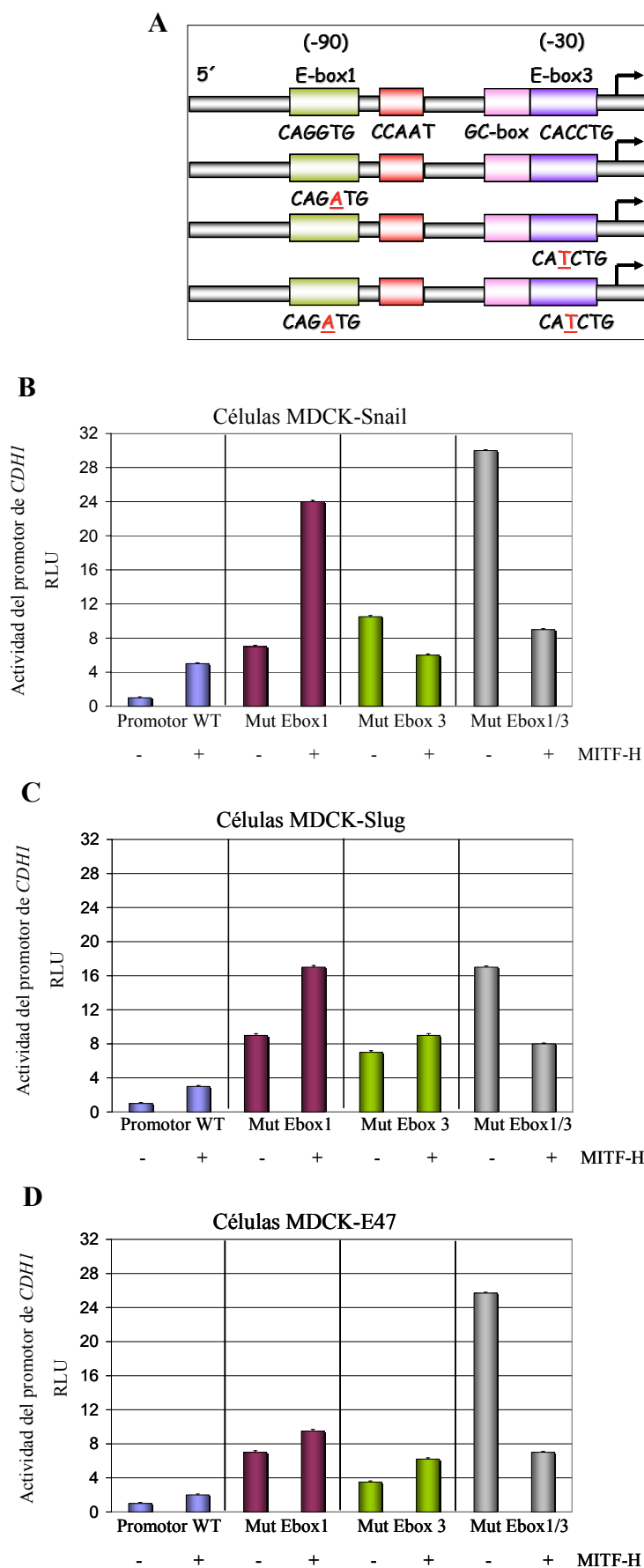
Por tanto, decidimos analizar la implicación de las cajas E1 y E3 en la acción de MITF-H, utilizando construcciones con mutaciones individuales en cada una de ellas, así como en ambas cajas simultáneamente (Fig.16A) en ensayos de transfección en las líneas MDCK-Snail, -Slug y -E47. La mutación en cualquiera de las dos cajas E, indujo la desrepresión de la actividad basal del promotor de cadherina-E (3-10 veces) en los tres tipos celulares, mientras que la mutación simultánea de las dos cajas induce un efecto sinérgico sobre la actividad basal en células MDCK-Snail (Fig.16B) y MDCK-E47 (Fig.16D), y un efecto aditivo en MDCK-Slug (Fig.16C). La mutación en la caja E1 parece ser prescindible para la estimulación del promotor por MITF-H en células MDCK-Snail y Slug (Fig.16B y C, paneles Mut Ebox1); mientras que la caja E3, parece ser esencial para la activación del promotor de cadherina-E mediado por MITF-H en células MDCK-Snail y -Slug (Fig.16B y C, paneles Mut Ebox3), de acuerdo con otros estudios (Mansky et al., 2002a). En el caso de las células MDCK-E47, ambas cajas E1 y E3 parecen ser requeridas para la activación ejercida por MITF-H sobre el promotor de cadherina-E (Fig.16D). Curiosamente, la fuerte desrepresión de la actividad basal del promotor de cadherina-E por la mutación simultánea de las dos cajas E, es bloqueada parcialmente en presencia de MITF-H en los tres tipos celulares, sugiriendo la existencia de mecanismos de competición de MITF-H con otros factores reguladores positivos endógenos.

### 3.2. Estudio del promotor de *CDHI* en líneas tumorales humanas

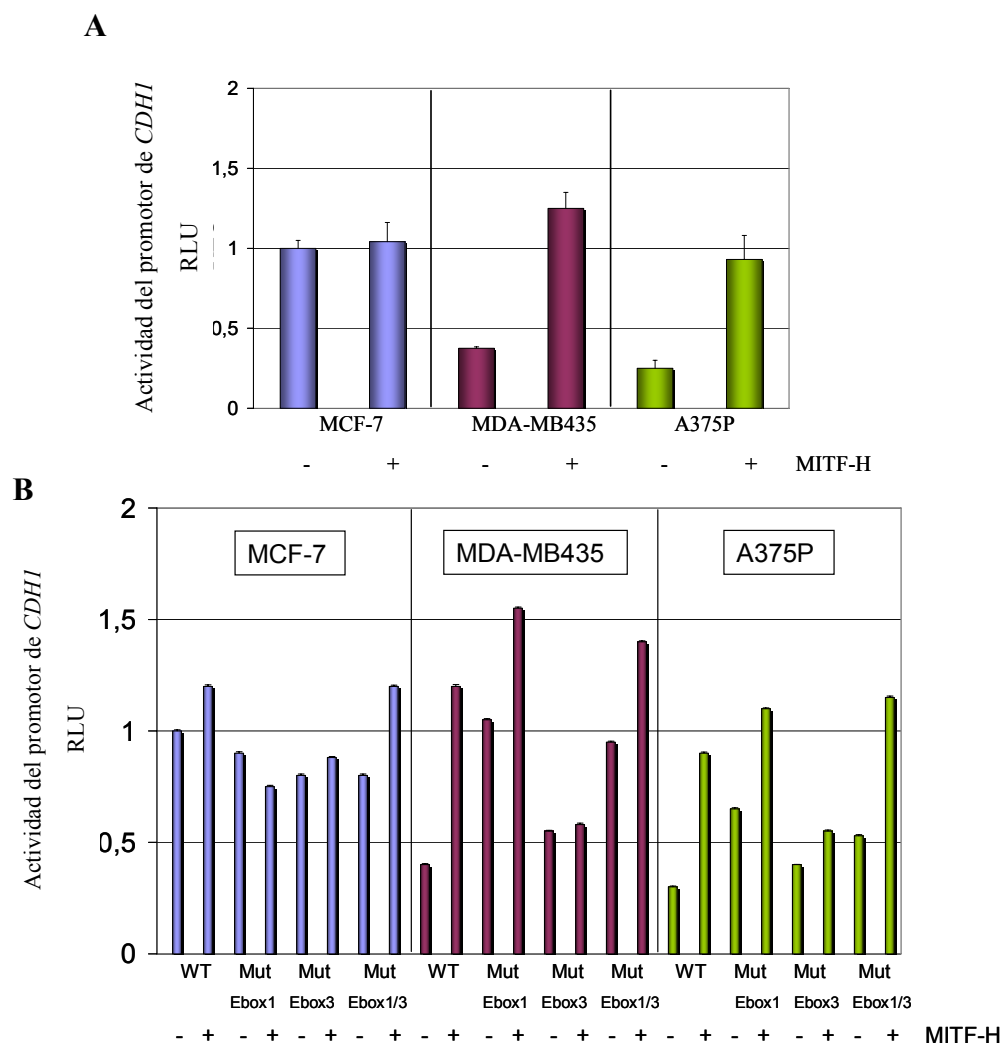
Estudios similares se realizaron con las líneas celulares humanas analizadas previamente, para la expresión de MITF-H (ver apartado 1.3 y 2.2) (Figs.9 y 14). Las líneas desdiferenciadas, de mama (MDA-MB435) y de melanoma (A375P), muestran una represión de 60-80% de la actividad del promotor de *CDHI* con respecto a la línea diferenciada MCF7 (Fig.17A), de acuerdo a los bajos niveles de expresión de cadherina-E en ambas líneas celulares (Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Como se muestra en la Fig.17A, la transfección transitoria de MITF-H indujo una fuerte activación del promotor humano de cadherina-E, en células MDA-MB435 y A375P, hasta niveles similares o algo superiores a los obtenidos en la línea MCF7, cuya actividad no se modifica en presencia de MITF-H.

El análisis de las construcciones del promotor de *CDHI* con mutaciones en las cajas E1 y/o E3, mostró el requerimiento de la caja E3 (y la colaboración de la caja E1) en la actividad basal del promotor en las células MDA-MB435 y A375P y en la activación mediada por MITF-H (Fig.17B).

Estos datos, por tanto, confirmaban la regulación positiva del promotor de *CDHI* por MITF-H y el requerimiento de la caja E3 y la colaboración de la caja E1 en ciertos tipos celulares.



**Fig. 16 Efecto de MITF-H en el promotor de *CDH1* mutado en distintas cajas E. (A)** Esquema del promotor de *CDH1* humano, donde se señalan la posición y el tipo de mutación en las cajas E. **(B-D)** Efecto de la expresión transitoria de MITF-H (100ng), en el promotor de *CDH1* silvestre (WT) y en promotores con mutaciones en las cajas E1 y/o E3 en células **(B)** MDCK-Snail, **(C)** MDCK-Slug y **(D)** MDCK-E47. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) a las 24h de la transfección. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes para cada una de las condiciones experimentales.



**Fig. 17 Efecto de MITF-H en la actividad del promotor humano de *CDH1* en líneas humanas. (A)** Efecto de la expresión transitoria de MITF-H (100ng) sobre la actividad del promotor de *CDH1* silvestre (WT) y **(B)** del promotor de *CDH1* con mutaciones en distintas cajas E (Ebox1, Ebox3 y Ebox1/3) (Ver Fig.16A). Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) a las 24h de transfección. Los valores se normalizaron en todos los casos a los obtenidos para la línea diferenciada de carcinoma de mama MCF-7 y representan la media +/- la desviación estándar de, al menos, dos experimentos independientes, para cada una de las condiciones indicadas.

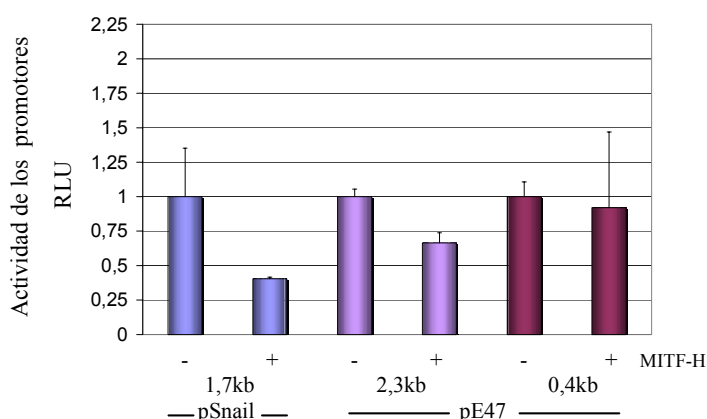
#### 4. Regulación de los factores Snail y E47 por MITF-H

Los resultados anteriores, habían revelado la implicación de los factores Snail, Slug y E47 en la represión transcripcional del gen de MITF-H y la participación de éste en la regulación positiva del promotor de *CDH1*. Por otra parte, estudios previos habían descrito que Slug es una diana génica de MITF-M durante la diferenciación y maduración de los melanocitos (Sanchez-Martin et al., 2002). Esta observación sugería la posibilidad de que otros factores como Snail y E47 pudieran, a su vez, estar

siendo regulados por MITF-H, dada la existencia de potenciales cajas E reconocibles por MITF, en los promotores de los genes de *Snail* y de *E2A* (codifica por *E47*). Decidimos, por tanto, analizar la regulación a nivel transcripcional de ambos genes, *Snail* y *E2A*, por MITF-H en el modelo celular de MDCK.

#### 4.1. Efecto de MITF-H sobre los promotores de *Snail* y *E2A*

Se analizó la acción de MITF-H sobre la actividad de los promotores de *Snail* y *E2A* (promotor de *E47*) disponibles en el laboratorio; en concreto, el promotor humano de *Snail* de ~1,7kb (-1637 a +129) y dos construcciones del promotor murino de *E2A*, una de ellas de ~2,3kb (-2994 a +62) y otra de ~0,4Kb (-382 a +62). La actividad de todas ellas se analizó en presencia y ausencia de MITF-H en células MDCK parentales.



**Fig. 18 Efecto de MITF-H sobre la actividad de los promotores de *Snail* y *E2A*.** Efecto de la expresión transitoria de MITF-H (100 ng) sobre el promotor de *Snail* humano (1,7kb) y sobre los promotores de *E2A* murino (2,3kb y 0,4kb) en células MDCK. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) a las 24h de la transfección. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes para cada una de las condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos (Fig.18), mostraron una represión significativa del promotor de *Snail* (60% aproximadamente) y en menor medida del promotor largo (2.3Kb) de *E2A* (30% aproximadamente) por MITF-H, mientras que no se observó ningún efecto sobre el promotor corto (400pb) de *E2A*. Cabe destacar, la presencia de varias cajas E potencialmente reconocibles por MITF-H, en el promotor de *E2A* (2,3Kb), que han sido eliminadas en la construcción de 0,4Kb del promotor (datos no mostrados). Estos resultados apoyan la regulación negativa de *Snail* y *E47* por MITF-H a nivel transcripcional y por tanto, la existencia de mecanismos de regulación cruzada entre los diferentes factores.

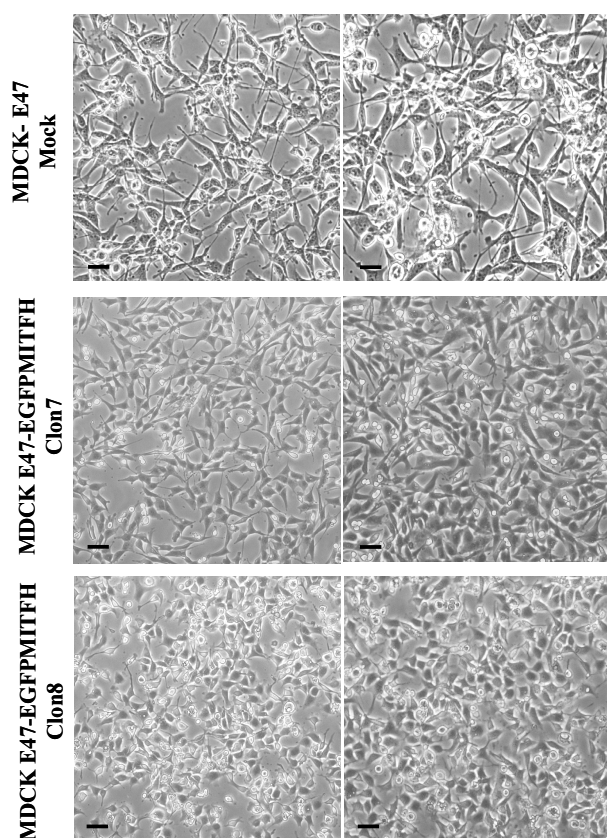
## 5. Ganancia de función de MITF-H en el modelo MDCK

Para obtener más información acerca del papel de MITF-H en la regulación de la expresión de cadherina-E, y su relación con los distintos represores *Snail*, *Slug* y *E47*, decidimos llevar a cabo estudios de ganancia de función de MITF-H, en células MDCK que sobreexpresaban establemente los

factores Snail, Slug y E47. Estas células, como se mencionó en la Introducción, han sufrido un proceso completo de TEM, asociado a la pérdida de expresión de cadherina-E y otros marcadores epiteliales, y a la adquisición de marcadores mesenquimáticos (Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001). Los tres tipos celulares, MDCK-Snail, -Slug y -E47, fueron transfectados establemente con el vector pZeo(-) vacío o pZeo(-)EGFPC1-MITFH humano (ver Materiales y Métodos).

### 5.1. Caracterización celular/fenotípica de los clones MDCK-E47-EGFP-MITFH

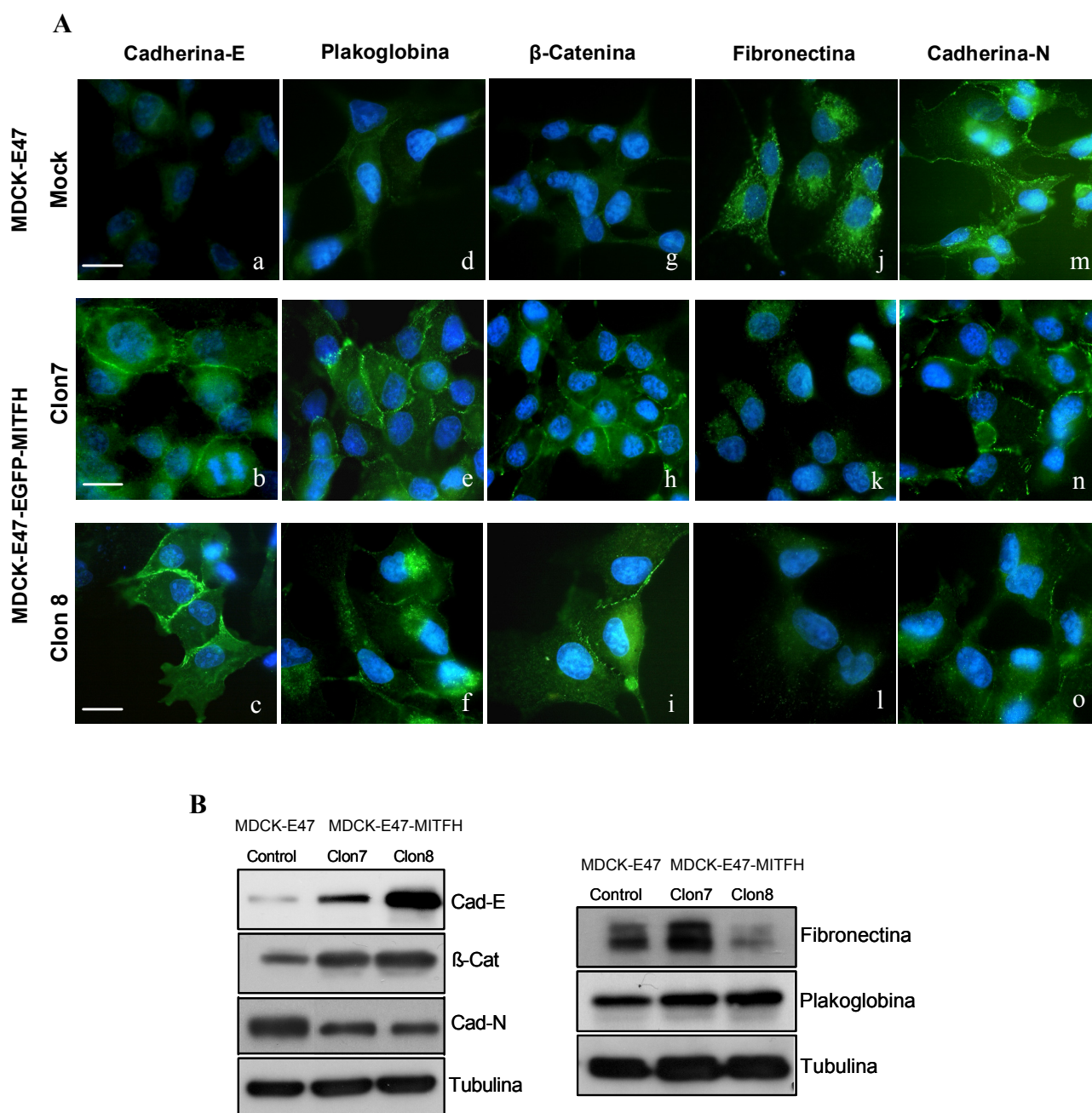
Tras varios análisis de todos los clones obtenidos, sólo los clones derivados de células MDCK-E47-EGFP-MITFH fueron capaces de mostrar una transición del fenotipo fibroblástico a un fenotipo epitelioide (Fig.19 y datos no mostrados), por lo que nos centramos en el estudio de este sistema celular, seleccionando los clones 7 y 8, de entre un total de 10 clones independientes aislados.



**Fig. 19 Estudio del fenotipo en dos clones MDCK-E47-EGFP-MITFH frente a un clon MDCK-E47 control.** Imágenes de contraste de fase de cultivos vivos subconfluentes crecidos a 60% (paneles izquierda) y 80% (paneles derecha) de confluencia, de un clon MDCK-E47 control (MDCK-E47 Mock) y dos clones de MDCK-E47-EGFP-MITFH (clon 7 y 8). En los transfectantes estables de EGFP-MITFH, se aprecia el cambio de fenotipo mesenquimático (en el control) a epitelioide (en clones 7 y 8). Barra: 40µm

Los cambios fenotípicos observados en los clones derivados de MDCK-E47-EGFP-MITFH (clones 7 y 8), estaban asociados a la reexpresión y organización de cadherina-E en los contactos célula-célula (Fig.20A, b y c), a un aumento parcial y redistribución de otros marcadores epiteliales como plakoglobina (Fig.20A, e, f) y  $\beta$ -catenina (Fig.20A, h, i) y a una disminución o reorganización de marcadores mesenquimáticos como fibronectina (Fig.20A, k, l) y cadherina-N (Fig.20A, n, o), respecto

a las células MDCK-E47 control (Fig.20A, paneles superiores). Adicionalmente, la mayoría de los cambios cualitativos observados por inmunofluorescencia en los marcadores epiteliales y fibroblásticos, fueron confirmados mediante análisis por *Western Blot* (Fig.20B).



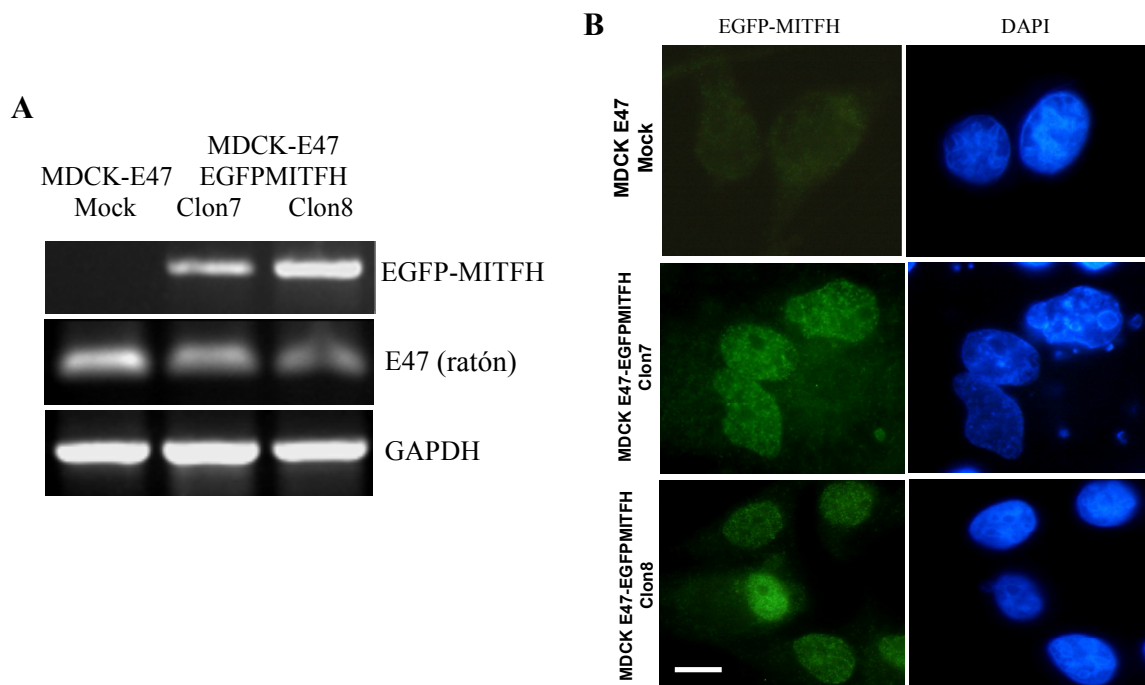
**Fig. 20 Estudio de marcadores epiteliales y mesenquimáticos en dos clones MDCK-E47-EGFP-MITFH frente a un clon MDCK-E47 control (Mock).** (A) Imágenes de inmunofluorescencia de las líneas celulares indicadas mostrando localización y organización de cadherina-E (a-c), plakoglobina (d-f),  $\beta$ -catenina (g-i), fibronectina (j-l) y cadherina-N (m-o). En los clones derivados de la transfección estable de EGFP-MITFH, se aprecia el aumento en la expresión de cadherina-E, plakoglobina y  $\beta$ -catenina, y la pérdida de tinción de fibronectina y cadherina-N. Núcleos marcados con Dapi. Barra: 15 $\mu$ m. (B) Análisis mediante *Western Blot* de los marcadores indicados. Como control de carga se utilizó  $\alpha$ -tubulina. Cad-E: cadherina-E; Cad-N: cadherina-N;  $\beta$ -Cat:  $\beta$ -Catenina.



Con el objeto de verificar, que los cambios fenotípicos observados no eran debidos a la pérdida del transgén murino de E47 con el que las células MDCK-E47 fueron generadas (Perez-Moreno et al., 2001), se analizó la expresión mediante RT-PCR del transcrito murino de E47 en los clones aislados tras las transfección con MITF-H. Los resultados obtenidos, confirmaron que ambos clones seguían expresando el factor E47 murino (aunque a niveles algo inferiores a los de las células control) (Fig.21A). Por otra parte, la expresión del transgén de EGFP-MITFH y su localización nuclear, fue confirmada mediante RT-PCR e inmunofluorescencia (Fig.21A y B), respectivamente, apoyando que los cambios observados eran ocasionados por la expresión estable de MITF-H.

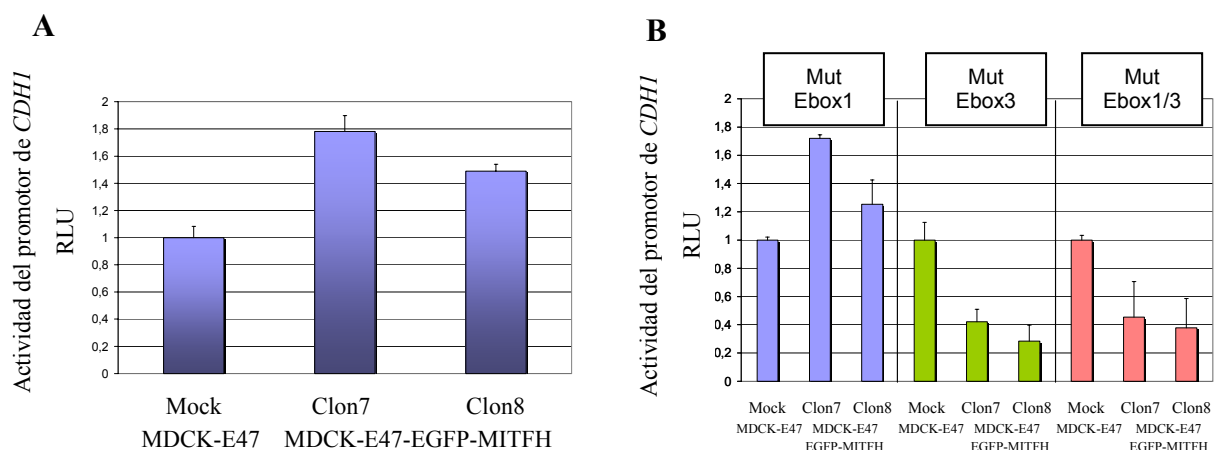
## 5.2. Actividad del promotor de *CDH1* tras la expresión estable de MITF-H en células MDCK-E47

Para profundizar en la regulación de la expresión de cadherina-E de los clones MDCK-E47-EGFP-MITFH, se analizó la actividad del promotor silvestre y construcciones con mutaciones en las cajas E del promotor de *CDH1*. Como se puede observar en la Fig.22, los resultados obtenidos muestran que la expresión estable de EGFP-MITF-H en células MDCK-E47, induce la activación del promotor de cadherina-E (Fig.22A), y que este efecto se ejerce fundamentalmente a través de la caja E3 (Fig.22B), ya que la mutación de la caja E1 no afectó en absoluto a la actividad del promotor en ninguno de los dos clones MDCK-E47-EGFP-MITFH analizados.



**Fig. 21** Análisis de los niveles de expresión del transgen EGFP-MITFH y de E47 murino, en los clones derivados de MDCK-E47-EGFP-MITFH. (A) Análisis mediante RT-PCR de los niveles de expresión del transgen EGFP-MITFH y de E47 de ratón. Los niveles de GAPDH sirven como control de carga. (B) Inmunofluorescencia de EGFP-MITFH para detectar los niveles de expresión y localización de MITF-H en los clones 7 y 8 de las células MDCK-E47-EGFP-MITFH. Los núcleos fueron teñidos con Dapi. Barra: 10µm.

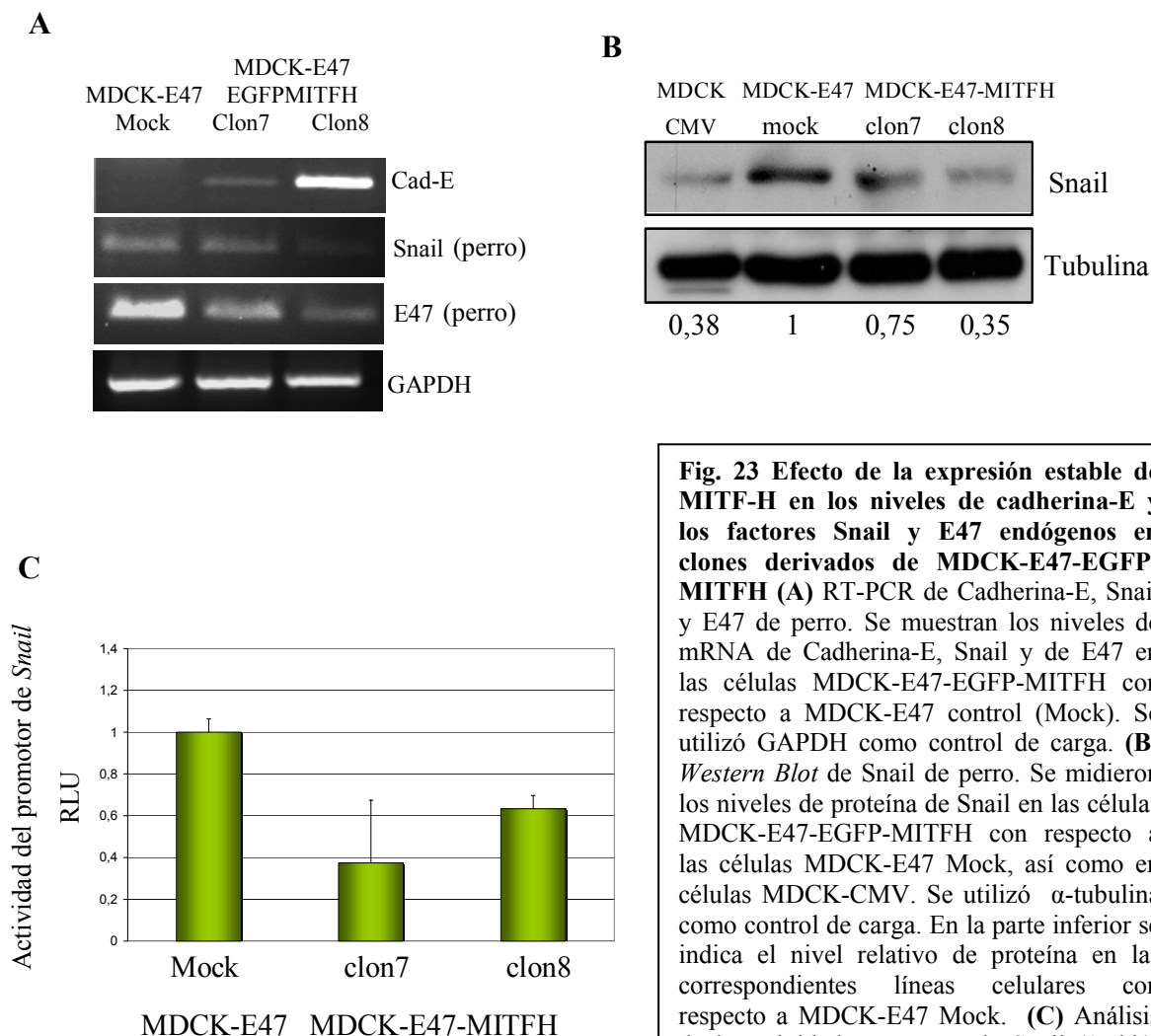




**Fig. 22 Efecto de la expresión estable de MITF-H sobre la actividad del promotor de *CDH1* en clones derivados de MDCK-E47-EGFP-MITFH.** (A) Efecto de la expresión estable de EGFP-MITFH sobre el promotor de *CDH1* silvestre y (B) sobre el promotor de *CDH1* con mutaciones en las cajas E (Ebox1, Ebox3 y en Ebox1/3) (Ver Fig.16A). Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) a las 24h de la transfección. Los resultados se normalizaron a la actividad obtenida con cada una de las construcciones respecto a las células control MDCK-E47 Mock. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes para cada una de las condiciones experimentales.

### 5.3. Efecto de MITF-H sobre la expresión de los factores Snail y E47 en células MDCK-E47

Los resultados anteriores sobre la acción de MITF-H en la actividad de los promotores de *Snail* y *E2A* (ver apartado 4.1), indicaban la existencia de una regulación negativa *feed-back* entre los factores MITF-H, Snail y E47, sugiriendo que la represión que ejerce MITF-H sobre los represores Snail y E47 podría ser responsable de la reactivación de la expresión de cadherina-E observada en los clones MDCK-E47-EGFP-MITFH. Para confirmar esta hipótesis, analizamos los niveles de expresión de Snail, y E47 endógenos, en los clones aislados derivados de MDCK-E47-EGFP-MITFH. A nivel de mRNA, la expresión tanto de Snail, como de E47 endógenos, se encuentra significativamente reprimida en los clones MDCK-E47-EGFP-MITFH (Fig. 23A). Adicionalmente, pudimos confirmar la relación existente entre el aumento de mRNA de cadherina-E con la disminución de los transcritos de Snail y E47 en las células MDCK-E47-EGFP-MITFH (Fig. 23A), de acuerdo con los niveles de cadherina-E a nivel de proteína detectados en dichos transfectantes (Fig. 20B). En el caso de Snail, se pudo comprobar la represión de su expresión a nivel de proteína (Fig.23B), así como la disminución de la actividad del promotor de *Snail* en los clones de MDCK-E47-EGFP-MITFH (Fig.23C).



**Fig. 23 Efecto de la expresión estable de MITF-H en los niveles de cadherina-E y los factores Snail y E47 endógenos en clones derivados de MDCK-E47-EGFP-MITFH (A) RT-PCR de Cadherina-E, Snail y E47 de perro. Se muestran los niveles de mRNA de Cadherina-E, Snail y de E47 en las células MDCK-E47-EGFP-MITFH con respecto a MDCK-E47 control (Mock). Se utilizó GAPDH como control de carga. (B) Western Blot de Snail de perro. Se midieron los niveles de proteína de Snail en las células MDCK-E47-EGFP-MITFH con respecto a las células MDCK-E47 Mock, así como en células MDCK-CMV. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. En la parte inferior se indica el nivel relativo de proteína en las correspondientes líneas celulares con respecto a MDCK-E47 Mock. (C) Análisis de la actividad promotora de Snail (1,7kb), en clones derivados de las células MDCK-E47-EGFP-MITFH. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) a las 24h de transfección. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes.**

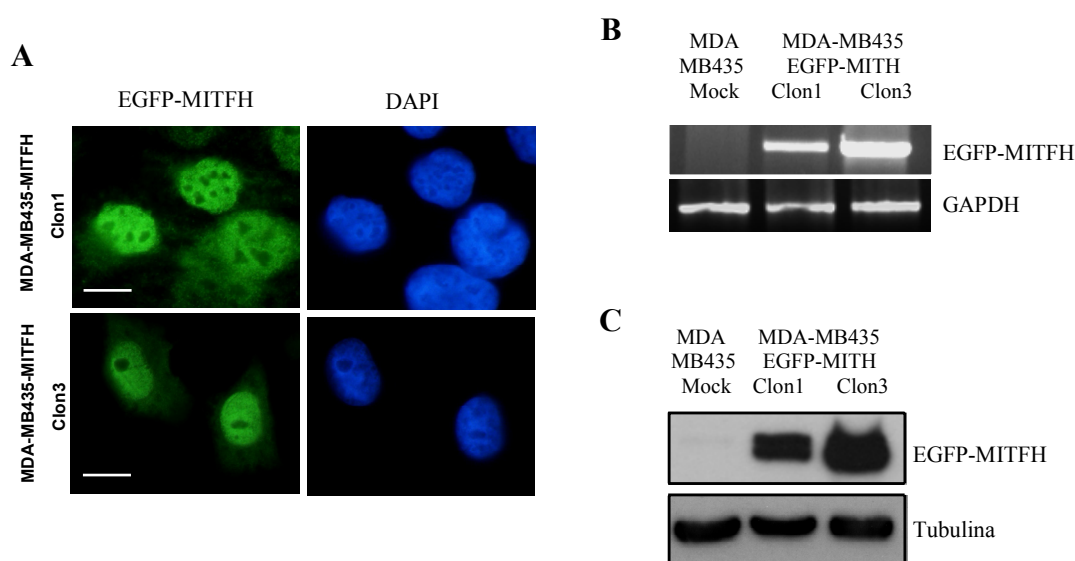
En conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el factor MITF-H actuaría como represor directo o indirecto de Snail y E47, facilitando así la activación de la expresión de cadherina-E en los clones MDCK-E47-EGFP-MITFH. Además, la represión ejercida sobre Snail y/o E47 puede ser responsable de los cambios observados en otros marcadores y de la TME parcial observada, tras la expresión de MITF-H en células MDCK-E47.

## 6. Transfección estable de MITF-H en células MDA-MB435

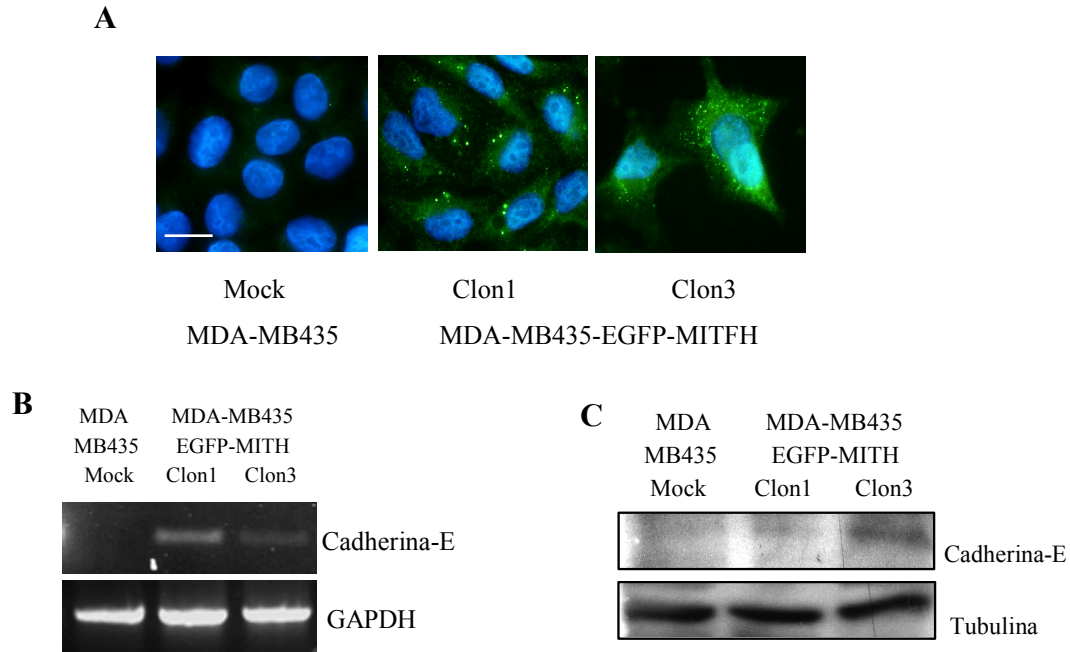
### 6.1. Caracterización celular/fenotípica de los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH

Las líneas humanas MDA-MB435, fueron de igual forma, transfectadas establemente con el vector de expresión EGFP-MITF-H, con el fin de poder estudiar como afecta la ganancia de función de este factor, en el comportamiento de esta línea celular. Obtuvimos un total de 6 clones, a partir de la transfección con pEGFPC1-MITFH, de los cuales seleccionamos dos, por la alta expresión del transgén y un total de cuatro clones control, de los que seleccionamos uno (Fig.24).

Todos los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH, presentaban un fenotipo similar al de las células MDA-MB435 control, sin cambios aparentes. Sin embargo, el análisis de estos clones mediante RT-PCR, mostró débil expresión cadherina-E, en los clones seleccionados con mayor expresión del transgén EGFP-MITFH (Fig.25). Los análisis mediante inmunofluorescencia, mostraron la expresión de cadherina-E en los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH seleccionados, si bien no estaba organizada en los contactos célula-célula, sino que aparecía distribuida en agregados en el citoplasma celular sin llegar a formar ninguna estructura en la membrana de la célula (Fig.25A). Los análisis de RT-PCR y *Western Blot* confirmaron la reexpresión de cadherina-E en los clones seleccionados (Fig.25B y C).

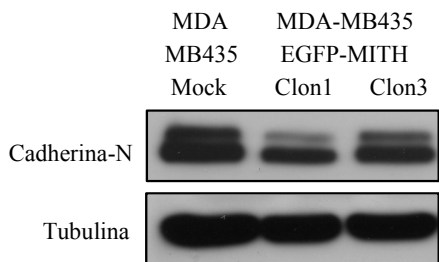


**Fig. 24 Estudio de los niveles de expresión del transgen MITF-H en las células MDA-MB435-EGFP-MITFH.** Niveles de expresión y localización de EGFP-MITF, en los clones derivados de MDA-MB435-EGFP-MITFH observados por (A) inmunofluorescencia, (B) RT-PCR y (C) *Western Blot*. Para el caso de las inmunofluorescencias los núcleos fueron teñidos con Dapi. Se utilizaron los niveles de GAPDH y  $\alpha$ -tubulina como control de carga de RT-PCR (B) y *Western-Blot* (C), respectivamente. Barra: 10 $\mu$ m.



**Fig. 25 Estudio de los niveles de expresión de cadherina-E en las células MDA-MB435-EGFP-MITFH.** Niveles de expresión y localización de cadherina-E, en los clones derivados de MDA-MB435-MITFH observados por (A) inmunofluorescencia, (B) RT-PCR y (C) *Western Blot*. Para el caso de las inmunofluorescencias los núcleos fueron teñidos con Dapi. Barra 15µm. Se utilizaron los niveles de GAPDH y  $\alpha$ -tubulina como control de carga de RT-PCR (B) y *Western-Blot* (C), respectivamente.

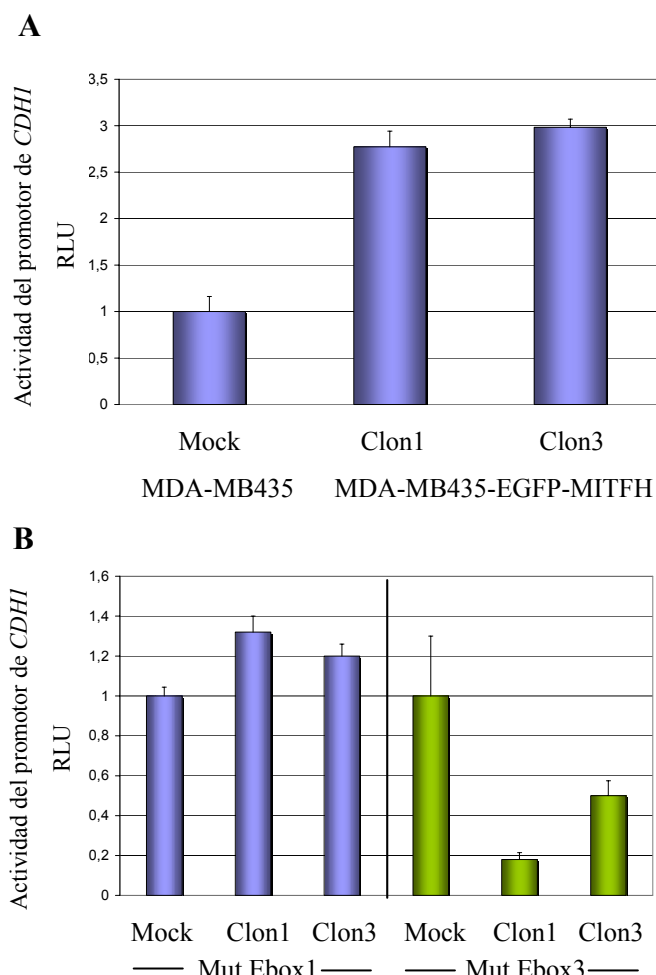
Por otra parte, del resto de marcadores analizados, y a diferencia de los resultados obtenidos en las células MDCK-E47-EGFP-MITFH (en los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH), sólo se observaron cambios en la expresión de cadherina-N (Fig.26). Resultados similares, en cuanto a la inducción/localización de cadherina-E y otros marcadores, se obtuvieron en la transfección estable de EGFP-MITFH en células A375P (datos no mostrados).



**Fig.26 Estudio de los niveles de expresión de cadherina-N en las células MDA-MB435-EGFP-MITFH.** Niveles de expresión de cadherina-N, en los clones derivados de MDA-MB435-EGFP-MITFH analizados mediante *Western Blot*. Se utilizaron los niveles de  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

A continuación, se analizó la actividad del promotor de *CDH1* humano en los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH. Como se observa en la Fig.27A, la expresión estable de MITF-H en las células MDA-MB435-EGFP-MITFH, induce la activación del promotor de cadherina-E humano, de forma similar a lo observado en el modelo MDCK-E47-EGFP-MITFH. Por otra parte, la mutación de la caja E3, bloquea por completo la reactivación del promotor (Fig.27B), confirmando los resultados previos,

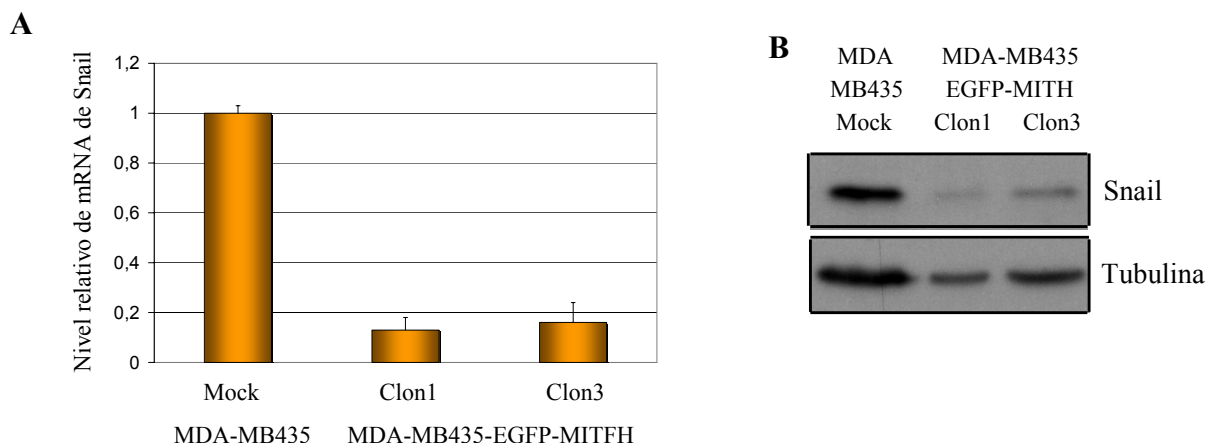
que ponían de manifiesto la importancia de la caja E3 durante el control positivo del factor MITF-H sobre la actividad de este promotor. Resultados similares se obtuvieron en la línea A375P y clones derivados tras la transfección estable de EGFP-MITFH (datos no mostrados).



**Fig. 27 Efecto de la expresión estable de MITF-H sobre el promotor de CDH1, en clones derivados de MDA-MB435-EGFP-MITFH (A) Efecto de la expresión estable de EGFP-MITFH en la actividad del promotor de CDH1 silvestre y (B) en el promotor de CDH1 con mutaciones en las cajas E (Ebox1 y Ebox3) (Ver Fig.16A). Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa) a las 24h de la transfección. Los resultados representan la media +/- la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes.**

## 6.2. Caracterización de la expresión del factor Snail en células MDA-MB435-EGFP-MITFH

Con el fin de profundizar en la relación entre el factor MITF-H y Snail, se analizó la actividad del promotor de Snail en los clones generados MDA-MB435-EGFP-MITFH. Como se aprecia en la Fig.28, el análisis de la expresión de Snail mediante RT-PCR cuantitativa (Fig.28A) y *Western-Blot* (Fig.28B), confirmó la fuerte represión de la expresión de Snail tanto a nivel de mRNA como de proteína, en los clones derivados de las células MDA-MB435-EGFP-MITFH. Adicionalmente, resultados similares fueron observados en clones derivados de las células A375P-EGFP-MITFH (datos no mostrados).



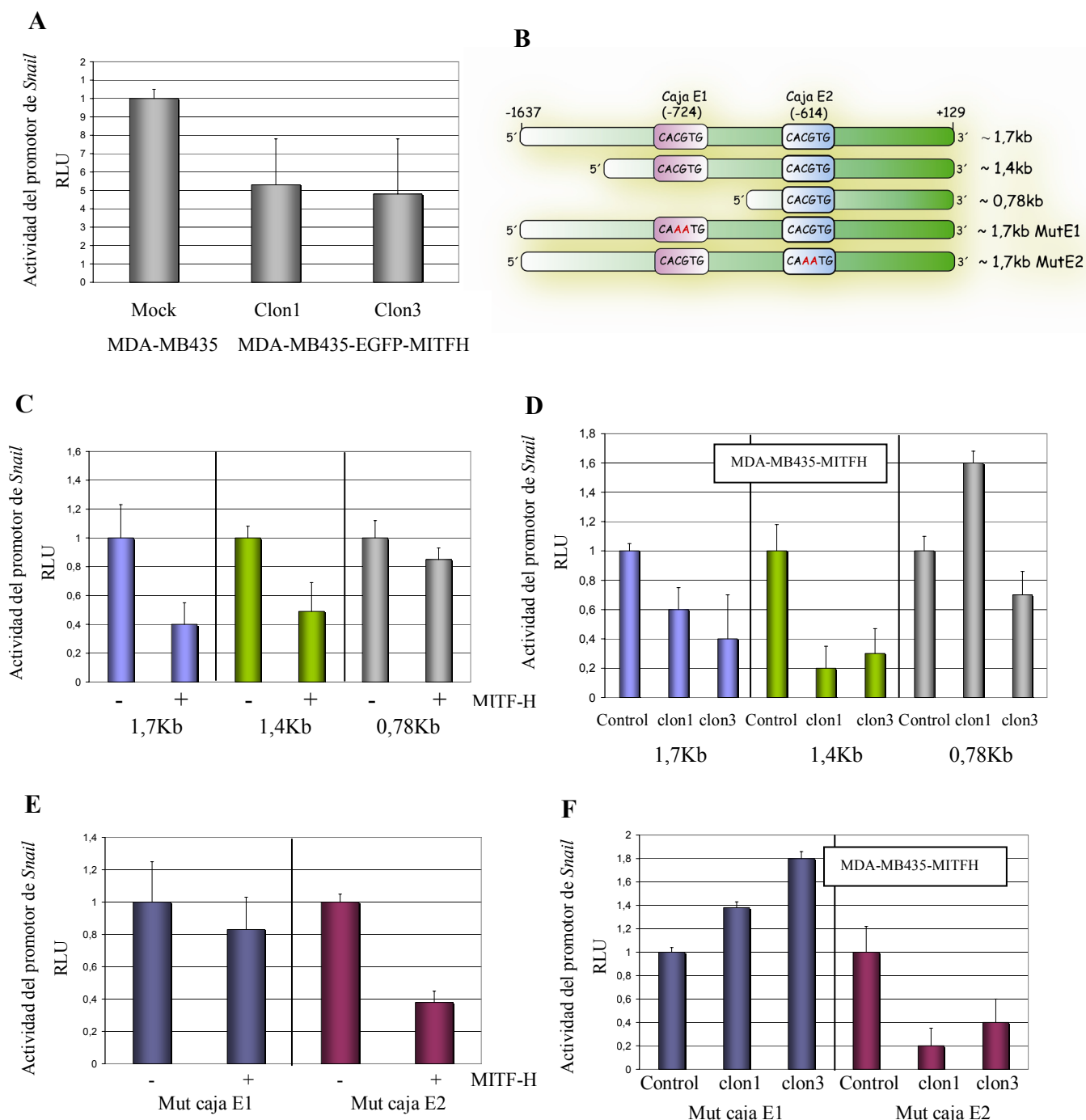
**Fig. 28 Análisis de los niveles de expresión de Snail en las células MDA-MB435-EGFP-MITFH.** Niveles de expresión de Snail, en los clones derivados de MDA-MB435-EGFP-MITFH medidos a nivel de **(A)** mRNA mediante RT-PCR cuantitativa, (respecto al control) y **(B)** de proteína, mediante *Western Blot*. Se utilizaron los niveles de  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Los resultados representan la media  $\pm$  la desviación estándar de, al menos, tres muestras analizadas en el experimento mostrado en el panel A y un experimento, de dos, representativo en el panel B.

### 6.2.1. Control transcripcional del factor Snail en los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH

Con el fin de profundizar sobre el control de MITF-H en la regulación del promotor de Snail, se analizó la actividad del promotor humano de Snail, en los clones derivados de la línea MDA-MB435-EGFP-MITFH. Los resultados obtenidos mostraron una represión del 50%, aproximadamente, para aquellos clones con mayor expresión del transgén EGFP-MITFH (Fig.29A), confirmando la regulación transcripcional negativa de Snail, por parte de MITF-H.

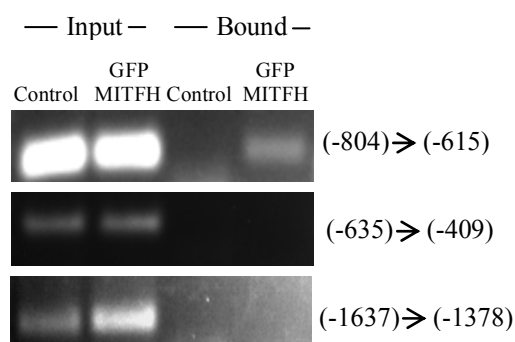
El análisis bioinformático de la región del promotor de Snail humano clonado (~1,7kb), indicó la presencia de dos cajas E (CACGTG): E1 a -724 y E2 a -614 (Fig.29B), descritas como secuencias de interacción de MITF-M al DNA (Bentley et al., 1994; Hemesath et al., 1994; Vetrini et al., 2004; Yasumoto et al., 1994). Con la finalidad de conocer a través de que regiones podría estar siendo regulado el promotor de Snail por MITF-H, realizamos distintas construcciones con mutaciones independientes en las dos cajas E mencionadas (caja E1 y caja E2). Por otra parte, también clonamos distintas delecciones a partir del extremo 5', del promotor de Snail (Fig.29B). Las distintas construcciones se analizaron en las células MDA-MB435 parentales, así como en los clones generados a partir de la expresión estable de MITF-H en estas mismas células. Como se aprecia en la Fig.29C, tanto la construcción completa del promotor de Snail (~1,7Kb), como la construcción de ~1,4Kb, son reprimidas por MITF-H, contrariamente a lo observado para la construcción de ~780pb, la cual carece de la caja E1 y otras regiones potencialmente implicadas para el proceso de represión. Este resultado se observa tanto en las células MDA-MB435 con expresión transitoria de MITF-H (Fig.29C), como en los clones estables MDA-MB435-EGFP-MITFH (Fig.29D). La implicación de la caja E1 en la regulación negativa del promotor de Snail, se confirmó utilizando construcciones con mutaciones específicas en las cajas E1 y E2 (Fig.29 E, F). Esta caja E1 (-724), la cual es eliminada en la construcción de 780pb

(Fig.29B), parece estar implicada en el proceso de represión, ya que su mutación (CACGTG → CAAATG) al igual que su eliminación, provocan que MITF-H no ejerza la regulación negativa del promotor de *Snail* tras su expresión transitoria (Fig.29E) o estable (Fig.29F).



**Fig. 29 Efecto de la expresión transitoria y estable de MITF-H sobre el promotor de *Snail*** (A) Actividad del promotor de *Snail* (1,7kb) en los clones derivados de MDA-MB435-EGFP-MITFH. (B) Esquema de las distintas construcciones del promotor de *Snail* utilizadas. (C) y (D) Estudio de la actividad de las construcciones del promotor de *Snail* delecionadas en (C) células MDA-MB435 parentales tras la transfección de EGFP-MITFH (100ng) y (D) en clones derivados de la línea MDA-MB435-EGFP-MITFH. (E) y (F) Actividad del promotor de *Snail* mutado en las cajas E1 y E2 de forma independiente, en (E) células MDA-MB435 parentales tras la transfección de EGFP-MITFH (100ng), y (F) en clones derivados de la línea MDA-MB435-EGFP-MITFH. Se representa la actividad relativa (RLU, unidades relativas de luciferasa). Los resultados representan la media +/- la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes.

Todos estos resultados demostraban una represión de MITF-H sobre el promotor de *Snail* humano, y la implicación de la caja E1, en posición -724. Con el fin de confirmar la posible interacción de MITF-H sobre el promotor de *Snail*, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), empleando células MDA-MB435 con expresión transitoria de pEGFPC1-MITF-H y anticuerpos contra EGFP y cebadores específicos contra distintas regiones del promotor de *Snail* (ver Materiales y Métodos). Como se aprecia en la Fig.30 (panel superior), los ensayos de ChIP muestran la interacción de MITF-H sobre la región comprendida entre las posiciones -804 hasta -615, y que contienen la caja E1 -724, anteriormente citada. Para el resto de regiones analizadas, el resultado fue negativo (Fig. 30, paneles intermedio e inferior), no demostrándose una unión del factor MITF-H a ninguna de las otras regiones analizadas, incluyendo la región que contiene la caja E2 (de -635 a -409).



**Fig. 30 Análisis de la interacción *in vivo* de MITF-H en el promotor de *Snail*.** Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células MDA-MB435 transfectados transitoriamente con pEGFPC1-MITFH o con el vector vacío (control). Las fracciones de cromatina se inmunoprecipitaron con anticuerpos contra EGFP (Bound) y tras el procesamiento adecuado, se amplificaron las regiones del promotor de *Snail* indicadas con los cebadores apropiados. Como control se amplificó en paralelo las regiones correspondientes a las fracciones de cromatina no unida (*Input*).

### 6.3. Estudio *in vivo* de las células MDA-MB435-EGFP-MITFH

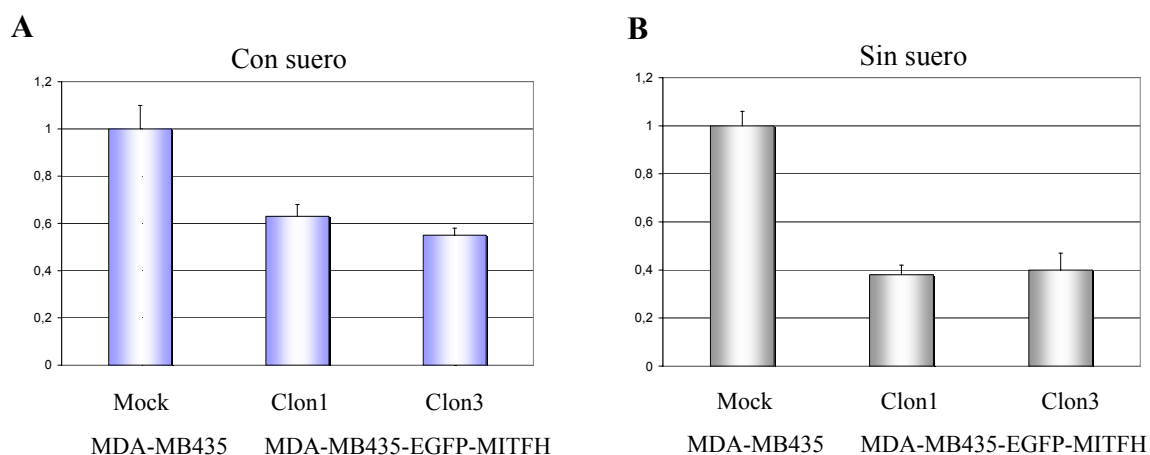
Los resultados obtenidos tras la expresión de MITF-H en células MDA-MB435, que conllevan la disminución en los niveles de *Snail* y la reexpresión de cadherina-E, nos llevaron a analizar las propiedades proliferativas y tumorogénicas de los clones obtenidos.

#### 6.3.1. Análisis de la proliferación celular en MDA-MB435-EGFP-MITFH

Una de las funciones más características de la isoforma M de MITF, es su papel dual durante la proliferación celular. Como se mencionó en la Introducción, MITF-M puede por si mismo decidir la regulación espacio-temporal de reguladores positivos y negativos del ciclo celular, durante el desarrollo de los melanocitos, siendo capaz de controlar el balance entre proliferación y diferenciación que sucede en estas células (Carreira et al., 2005; Du et al., 2004; Loercher et al., 2005; Prince et al., 2004; Vance and Goding, 2004). Este hecho nos motivó a estudiar las propiedades proliferativas de los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH. Los ensayos de proliferación (Fig.31), mostraron un menor crecimiento de las células MDA-MB435-EGFP-MITFH en cultivo, con respecto a los controles, tanto en presencia (Fig.31A) como en ausencia de suero (Fig.31B), siendo en este último caso más acusada. Resultados similares se obtuvieron en los ensayos de proliferación, en los clones generados con expresión estable



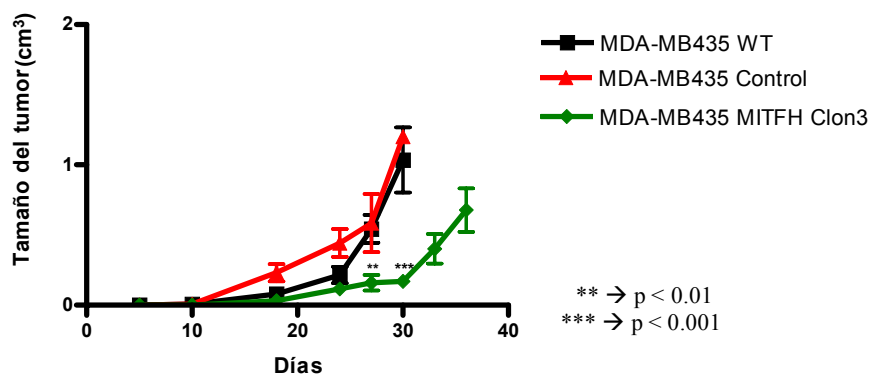
de MITF-H, de células MDCK-Snail, -Slug, y -E47 y en la línea humana A375P (datos no mostrados), apoyando un papel negativo del factor MITF-H sobre la proliferación celular.



**Fig. 31 Efecto de la expresión estable de MITF-H en la proliferación celular.** Ensayo de proliferación celular tanto en (A) presencia como en (B) ausencia de suero, en clones en cultivo derivados de la línea MDA-MB435-EGFP-MITFH y células MDA-MB435 control (Mock) durante 24h.

### 6.3.2. Ensayos de tumorigenicidad

El estudio *in vivo* de las propiedades tumorigénicas de los clones MDA-MB435-EGFP-MITFH y los controles correspondientes, se llevó a cabo mediante su inyección ortotópica en la glándula mamaria de ratones hembra nu/nu. Todas las líneas celulares indujeron tumores en todos los sitios de inyección (6/6). Sin embargo, el análisis del crecimiento de los mismos, mostró una notable disminución en la velocidad de crecimiento de los tumores desarrollados por las células MDA-MB435-EGFP-MITFH, con respecto a las células control y a las células MDA-MB435 parentales (WT) (Fig.32). Esta reducción en el crecimiento del tumor, fue aproximadamente del 70% a los 30 días tras la inyección.

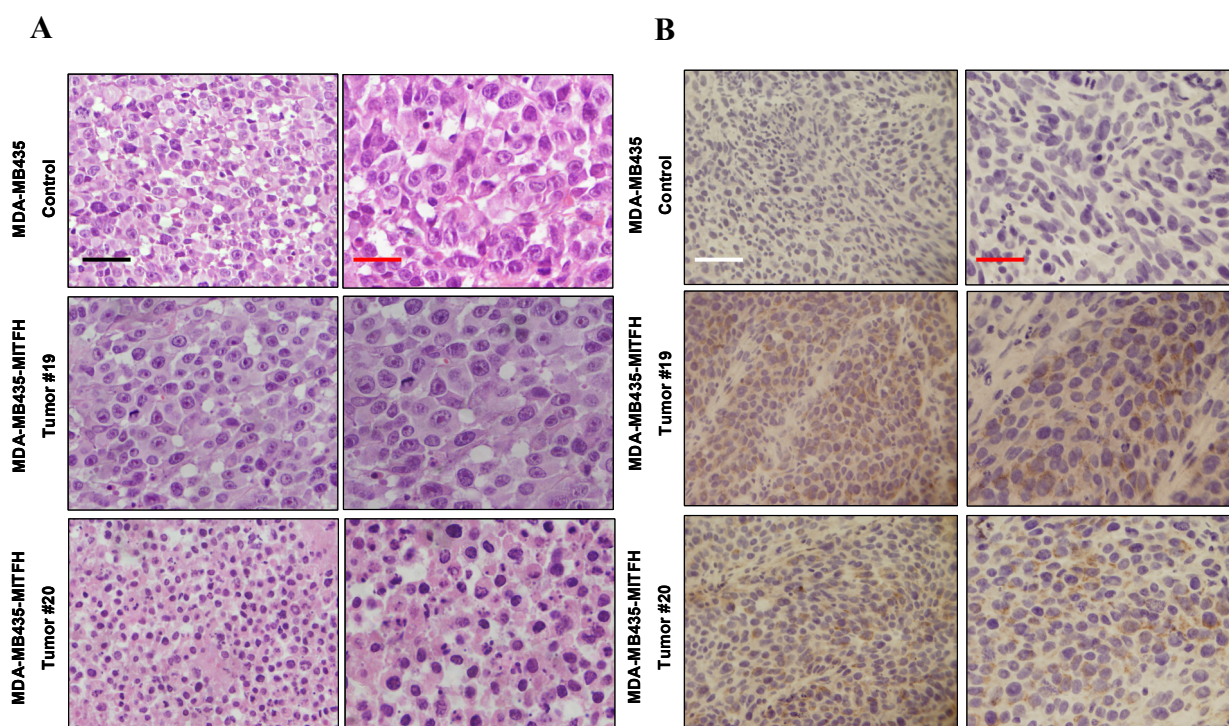


**Fig. 32 Efecto *in vivo* de las propiedades tumorigénicas de la línea MDA-MB435-EGFP-MITFH.** Estudio del crecimiento de los tumores generados por el clon3 de la línea MDA-MB435-EGFP-MITFH, frente a las células MDA-MB435 Control y MDA-MB435 parentales (WT). Tamaño del tumor medido en  $\text{cm}^3$ .

### 6.3.2.1. Análisis de los tumores generados

Los tumores de mama desarrollados por las células MDA-MB435-EGFP-MITFH, así como los generados a partir de las células control y parentales, fueron extirpados al alcanzar un tamaño medio aproximado entre 0,8-1 cm<sup>3</sup>, para el posterior análisis histológico y de marcadores.

El estudio histológico realizado sobre los tumores generados, reveló que se trataba de carcinomas sólidos de origen mamario bien delimitados. No se observaron diferencias significativas en la histología de los tumores derivados de las células control, de aquellos provenientes de las células MDA-MB435-EGFP-MITFH (Fig. 33), si bien estos últimos mostraban secciones con células más redondeadas que los tumores control, formados principalmente por células fusiformes. Significativamente, los tumores derivados de células MDA-MB435-EGFP-MITFH mostraban un aumento de células apoptóticas (Fig.33 comparar paneles inferior y medio con paneles superiores).

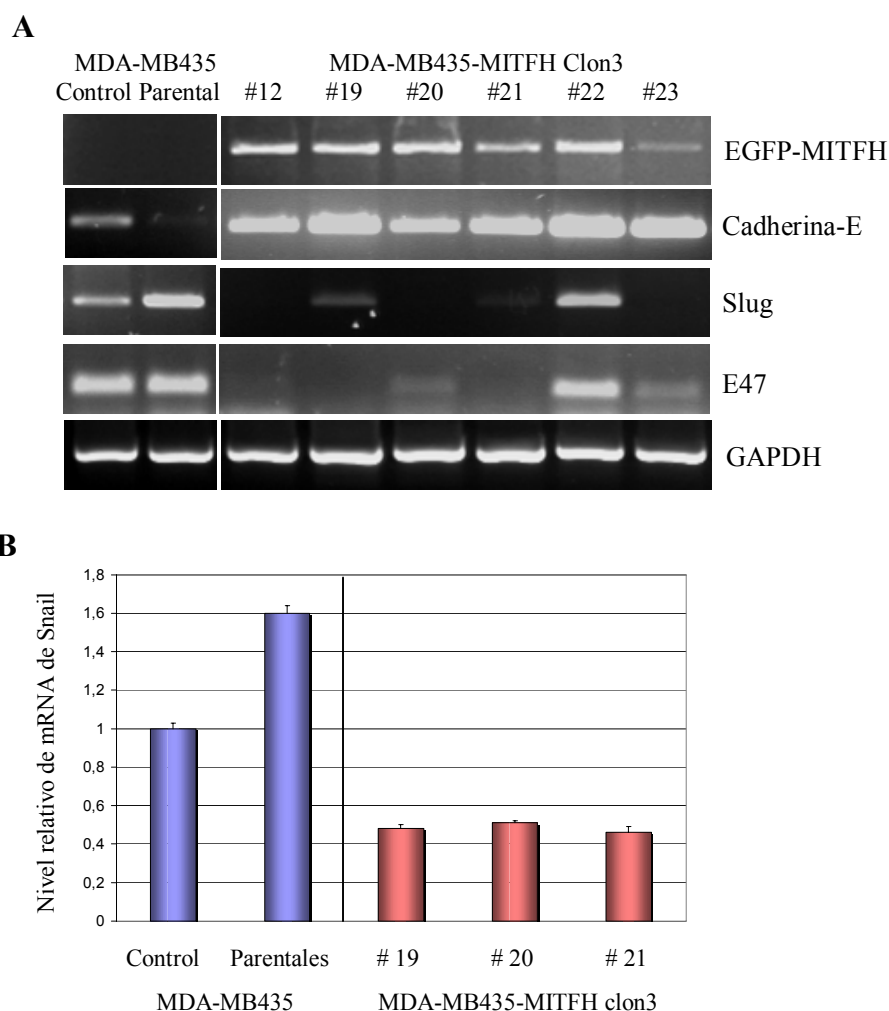


**Fig. 33 Análisis histológico y de expresión de cadherina-E.** **A** Hematoxilina-eosina e **B** inmunohistoquímica de cadherina-E sobre cortes de tejido de dos tumores independientes generados por las células MDA-MB435-EGFP-MITFH (clon3) (paneles medio e inferior) y por células MDA-MB435 control (panel superior). Barra negra: 40µm, barra roja: 30µm y barra blanca: 50µm

Los resultados anteriores, habían puesto de manifiesto la capacidad de MITF-H de inducir la reexpresión de cadherina-E *in vitro*, a través de su expresión estable en distintas líneas celulares.

Este hecho, nos motivó a examinar el patrón de expresión y localización en los tumores mediante inmunohistoquímica sobre cortes frescos del tejido. Como se muestra en la Fig.33B, se observó expresión de cadherina-E en los tumores inducidos por células MDA-MB435-EGFP-MITFH, aunque distribuida de forma dispersa por el citoplasma, sin llegar a organizarse de forma ordenada en los contactos célula-célula, al igual que se observa *in vitro*, en los cultivos celulares a partir de las inmunofluorescencias (Fig. 33B, paneles intermedio e inferior).

El análisis mediante RT-PCR semicuantitativa (Fig.34A) y cuantitativa (Fig.34B) de los tumores generados por las distintas líneas derivadas de MDA-MB435, reveló que los tumores generados por las células MDA-MB435-EGFP-MITFH, presentaban una clara reexpresión del mRNA de cadherina-E, asociada a la elevada expresión del transgén EGFP-MITFH, así como la ausencia de expresión del mRNA de los factores Snail (Fig.34B), Slug y E47 (Fig.34A), respecto a los tumores derivados de células control y parentales, en la mayoría de los tumores analizados.



**Fig. 34 Estudio de cadherina-E y de los factores Snail, Slug y E47, en los tumores generados por las células derivadas de la línea MDA-MB435-EGFP-MITFH y células control. (A) RT-PCR del transgén EGFP-MITFH y de los diferentes marcadores indicados a partir del mRNA extraído de tumores independientes derivados de MDA-MB435-EGFP-MITFH y células control y parentales (izda.). Se utilizó GAPDH como control de carga. (B) RT-PCR cuantitativa de los niveles de mRNA de Snail en los tumores indicados.**

En su conjunto, estos resultados apoyan que el factor de transcripción MITF-H posee la capacidad de inducir cadherina-E y frenar el crecimiento de tumores mamarios inducidos por las células MDA-MB435, asociado a una marcada reducción en la expresión de los factores Snail, Slug y E47.

## ***DISCUSIÓN***



## 1. Regulación de MITF en distintos modelos celulares

### 1.1. Caracterización de MITF-H

Recientemente nuestro grupo ha caracterizado cuatro factores de transcripción implicados en la pérdida de expresión de cadherina-E e inducción de TEM: Snail, Slug, E47 y E2-2A/B (Bolos et al., 2003; Cano et al., 2000; Perez-Moreno et al., 2001; Sobrado, V., Cano, A. y col., en preparación). La sobreexpresión de cualquiera de estos factores, provoca un cambio fenotípico en las células MDCK, que les proporciona propiedades migratorias e invasivas. La TEM inducida por estos factores implica, que además de la represión de la cadherina-E, deben influir en la regulación de la expresión de una amplia batería de genes implicados en este proceso (aumentando la expresión de genes mesenquimáticos y migratorios y reprimiendo genes epiteliales). El análisis del patrón de expresión génica mediante *microarrays*, en el sistema de células MDCK, ha permitido identificar un número de genes cuya expresión está alterada en células que expresan establemente los factores Snail, Slug o E47 (Moreno-Bueno et al., 2006). El estudio de estos genes nos ha llevado a analizar el factor MITF, un factor bHLH de clase III (Massari and Murre, 2000) implicado en desarrollo embrionario y fundamental para el desarrollo y maduración de varios tipos celulares (Hodgkinson et al., 1993; McGill et al., 2002; Oboki et al., 2002; Partington et al., 2004; Steingrimsson et al., 2004; Udonio et al., 2000; Widlund and Fisher, 2003). Actualmente, se conocen al menos nueve isoformas de MITF, una de las cuales (MITF-M) se ha implicado en la progresión tumoral (Garraway et al., 2005b; Miller et al., 2004; Salti et al., 2000; Selzer et al., 2002; Steingrimsson et al., 2004).

En la actualidad, la mayoría de los estudios publicados sobre MITF, se han centrado en el estudio de la isoforma M, durante el desarrollo y diferenciación de melanocitos, y muy poco se conoce sobre la regulación y función de esta y otras isoformas de MITF, en otros tipos celulares. Este hecho, se justifica por la gran importancia que ha adquirido MITF-M durante los últimos años en la progresión del melanoma y su implicación como factor desencadenante del síndrome Waardenburg tipo II en humanos. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha publicado ningún estudio que implique directamente a otras isoformas de MITF, en el proceso de la tumorigénesis.

Significativamente, la expresión de MITF está reprimida en células MDCK con expresión de cualquiera de los tres factores analizados (MDCK-Snail, -Slug y -E47), habiéndose corroborado los datos de *microarrays* por estudios de RT-PCR (Fig. 7). Adicionalmente, se caracterizó a MITF-H como la isoforma específica regulada en este sistema (Fig. 8B). Este hecho, junto con los datos que mostraban que el nivel de expresión de la región común de MITF, en estas mismas líneas, era similar al observado para la isoforma H, apoyan que MITF-H sea la única isoforma expresada en el modelo celular MDCK. Adicionalmente, MITF-H también se encuentra reprimido en células MDCK con expresión estable del factor E2-2A (Fig. 8C). Este factor, ha sido descrito recientemente por nuestro grupo como inductor de TEM en células MDCK (Sobrado, V., Cano, A. y col., en preparación), estando regulado positivamente

en las líneas MDCK-Snail, -Slug y -E47 (Moreno-Bueno et al., 2006). Significativamente, el factor E2-2 ha sido descrito como un represor de MITF-M, en melanocitos (Furumura et al., 2001).

En relación con estos resultados, cabe destacar, que aunque determinados tipos celulares, como los mastocitos, expresan varias isoformas del factor MITF (Mc, E, H, A y M), otros tipos celulares, como los cardiomiocitos, sólo son capaces de expresar una determinada isoforma (MITF-H) (Tshori et al., 2007). Aunque existe mucha controversia al respecto, estos datos indican que la expresión de las distintas isoformas de MITF, puede estar determinada por el tipo celular y su regulación depende, en muchos casos, de estímulos fisiológicos externos (Tshori et al., 2007).

Asimismo, experimentos adicionales en las líneas humanas de carcinoma de mama (MDA-MB231, MDA-MB435) y de melanoma (A375P) (líneas desdiferenciadas carentes de cadherina-E y con expresión de los factores Snail, Slug y E47 (Batlle et al., 2000; Cano et al., 2000; Moreno-Bueno et al., 2006)), señalaban a MITF-H como la isoforma reprimida también en otros tipos celulares (Fig. 9). Estos resultados, confirman, por una parte, los datos obtenidos en el modelo MDCK y, por otra parte, implican directa o indirectamente a los factores Snail, Slug y E47 en el control negativo de la isoforma H de MITF. De hecho, el papel del factor Snail en la regulación negativa de MITF-H, pudo ser confirmado en la línea MDA-MB231, ya que la expresión estable de un dominante negativo de Snail ( $\Delta$ Snag) en estas células, originó la desrepresión de MITF-H (Fig.9D).

La regulación negativa de MITF-H observada en las líneas humanas desdiferenciadas, MDA-MB231, MDA-MB435 y A375P, está de acuerdo con resultados de otros grupos en líneas de carcinomas de distintos orígenes, como las líneas celulares 501mel y HMV-II (procedentes de melanomas) o HMC1 y RAW (derivadas de distintos tipos de leucemias), que presentan bajos niveles de expresión de MITF-H con respecto a otras isoformas analizadas (Hershey and Fisher, 2005; Udono et al., 2000).

Por el contrario, el análisis mediante RT-PCR de la región común a todas las isoformas de MITF y de isoformas adicionales en células desdiferenciadas (MDA-MB231, MDA-MB435 y A375P), así como en la línea diferenciada de carcinoma de mama, MCF-7, mostró la expresión adicional de MITF-A (Fig. 9). Esta isoforma, no mostraba regulación negativa en ninguna de las líneas humanas analizadas, lo que está de acuerdo con datos publicados, donde se describe a MITF-A como un factor de expresión ubicua y cuyos niveles de expresión no se relacionan con el grado de diferenciación celular (Hershey and Fisher, 2005; Udono et al., 2000). Por otra parte, los resultados obtenidos en las células MDA-MB231- $\Delta$ Snag, indican que el factor Snail no regula la expresión de MITF-A, al menos en este tipo celular.

### **1.2. Regulación del promotor de MITF-H**

Con el fin de confirmar la regulación transcripcional negativa de MITF-H, clonamos una región del promotor H que contiene las potenciales secuencias reguladoras. De esta forma, pudimos observar que efectivamente el promotor se encuentra reprimido en las líneas MDCK con expresión estable de



Snail, Slug y E47 (Fig.10B). Sin embargo, los resultados obtenidos tras la expresión transitoria de los tres factores sugieren, que únicamente el factor bHLH, E47, actúa directamente sobre el promotor H (Fig.11C) y que los demás factores probablemente estén interviniendo de forma indirecta, quizás a través de la regulación de otras señales que finalmente regulen negativamente la expresión de MITF-H. Adicionalmente, la expresión transitoria del factor E2-2A mostró, al igual que E47, una capacidad de represión del promotor de MITF-H de forma directa (Fig.11D), confirmando los datos obtenidos en los estudios de RT-PCR. El hecho de que ambos factores bHLH (E47 y E2-2A), estuvieran regulando directamente la expresión del promotor de MITF-H, fue lo que nos llevó a caracterizar secuencias del promotor implicadas en el proceso. En concreto, la mutación de la caja E2 en posición -1196, impide parcialmente la represión del promotor por parte de ambos factores (Fig.12D), habiendo demostrado la interacción *in vivo* de E47 a la región del promotor de MITF-H que contiene esta caja E (Fig.13A). Estos resultados mostraban el requerimiento de la caja E2 en la represión ejercida sobre el promotor de MITF-H, al menos por parte de E47 y E2-2A. No obstante, la desrepresión observada en los ensayos de promotor con la mutación en la posición -1196 (Fig.12D), era parcial, no pudiendo descartar la implicación de otras cajas E, observadas en el análisis bioinformático de la secuencia promotora, en el proceso de represión del promotor de MITF-H por parte de ambos factores (E47 y E2-2A) (Fig.35).

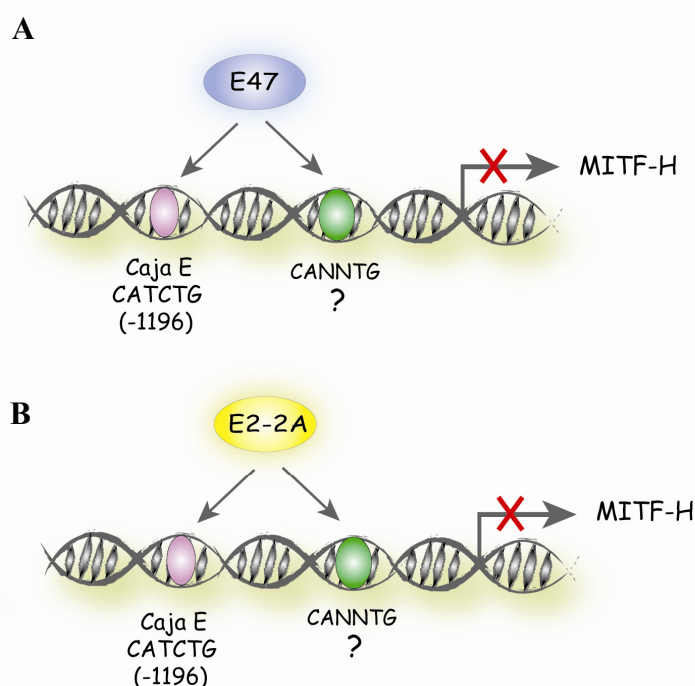
Resultados obtenidos en el análisis del promotor de MITF-H (-2151/+48) en líneas humanas de carcinomas y de melanoma (MDA-MB231, MDA-MB435, A375P), de las que se disponía de información acerca de la expresión de los factores Snail, Slug y E47 (Cano et al., 2000; Moreno-Bueno et al., 2006; Perez-Moreno et al., 2001), mostraron la represión de MITF-H a nivel transcripcional (Fig.14A), confirmando los datos de expresión de MITF-H a nivel de mRNA en estas mismas células. Además los ensayos de actividad promotora en la línea MDA-MB231 con expresión estable del dominante negativo de Snail, apoyaban la implicación de Snail en el control negativo de la transcripción del factor MITF-H (Fig.14B).

El mecanismo específico implicado en la represión de MITF-H por Snail/Slug es todavía desconocido. Los resultados obtenidos en el modelo celular MDCK, sugieren un mecanismo indirecto como se ha indicado. En relación con este hecho, se ha postulado que  $\beta$ -catenina, a través de la vía Wnt3A, es clave para la activación y mantenimiento de la isoforma MITF-M (Takeda et al., 2000b; Widlund et al., 2002). Durante este evento, el complejo TCF/Lef1 es activado y reclutado al núcleo para su posterior unión y activación del promotor. Resultados no mostrados del laboratorio, indican que los niveles de  $\beta$ -catenina disminuyen cuando se sobreexpresa Snail, Slug, E47 o E2-2A establemente en células MDCK, sugiriendo la participación de esta vía en la regulación negativa de MITF-H en este sistema. Significativamente, la región del promotor H utilizada en el presente trabajo (-2151/+48), contiene una secuencia consenso de unión al complejo TCF/Lef1 (-878), apoyando esta hipótesis.

Estudios adicionales serán necesarios para analizar directamente la participación de la vía  $\beta$ -catenina/TCF, en este proceso.

En conjunto, estos datos son coincidentes con los publicados por otros autores, en donde se pone de manifiesto como el promotor H se encuentra bajo un fuerte control negativo en líneas de melanoma desdiferenciadas, con respecto a otras líneas más diferenciadas. Además, deleciones del promotor de MITF-H demuestran el requerimiento de la secuencia comprendida entre -2153 y -616 para la represión del promotor en ciertas líneas de melanoma (Udono et al., 2000).

Finalmente, cabe mencionar que los ensayos de actividad promotora con el promotor de MITF-M en las líneas MDCK-Snail, -Slug y -E47, así como en las células control MDCK-CMV, mostraban una escasa actividad del promotor y descartaban la regulación transcripcional de MITF-M en este modelo celular.



**Fig. 35 Modelo propuesto para la acción de los factores bHLH, E47 y E2-2A, en la represión de MITF-H.** Se representa esquemáticamente los mecanismos utilizados por cada factor para la regulación negativa de MITF-H. **A** y **B** Los factores E47 y E2-2A reprimen de forma directa a MITF-H por interacción directa con la caja E2. Se plantea la implicación de cajas E adicionales en la represión del promotor, por ambos factores.

En resumen, nuestros resultados indican que MITF-H se halla reprimido tras la inducción de TEM por los factores Snail, Slug, E47 y E2-2A en células MDCK, así como en las líneas humanas desdiferenciadas (MDA-MB231, MDA-MB435 y A375P), implicando mecanismos de acción directos (E47/E2-2A) (Fig. 35) e indirectos (Snail/Slug).

## 2. Implicación de MITF-H en el proceso de activación de cadherina-E

Estudios previos en osteoclastos de ratón, habían puesto de manifiesto la relación directa entre MITF-M y la regulación de la expresión de cadherina-E, implicando a la caja E3 (-30) del promotor de cadherina-E, en la activación ejercida por MITF-M (Mansky et al., 2002a). Este hallazgo, nos impulsó a conocer si MITF-H, podría estar implicado en la regulación de cadherina-E. Nuestros resultados, mostraron la regulación positiva del promotor de cadherina-E por MITF-H (Fig. 15C y 17A) en todas las líneas celulares analizadas. Además, se pudo observar el requerimiento de la caja E3, en la activación transcripcional mediada por MITF-H en las líneas MDCK-Snail y -Slug (Fig.16B y C) y, adicionalmente, de la caja E1 en células MDCK-E47 (Fig.16D). Por otra parte, la caja E3 del promotor de cadherina-E, también mostró ser esencial en las líneas tumorales humanas MDA-MB435 y A375P (Fig.17B). Significativamente, nuestros datos indicaban que la regulación positiva del gen *CDHI* mediada MITF-H, únicamente ocurre en células desdiferenciadas con niveles basales de expresión de cadherina-E muy bajos. De hecho, los ensayos realizados tanto en la línea parental MDCK (Fig.15B), como en la línea humana de carcinoma de mama, MCF-7 (Fig.17A) (ambas diferenciadas y con expresión de cadherina-E), no mostraron regulación del promotor por parte de MITF-H.

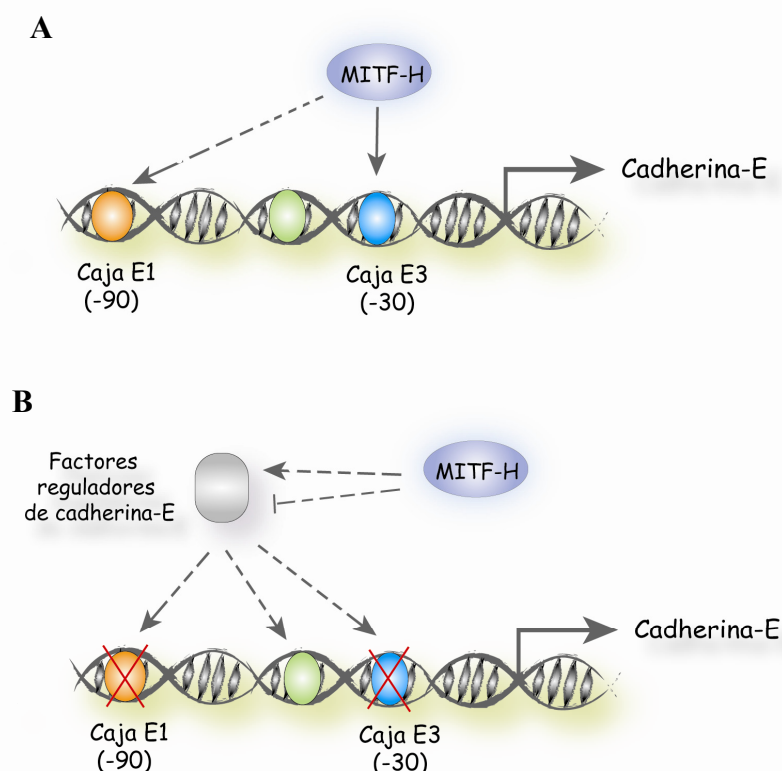
Resultados similares se han descrito en osteoclastos murinos, en donde MITF-M activa genes como *TRAP* (Luchin et al., 2000) o *catepsina K* (Motyckova et al., 2001), entre otros y que al igual que cadherina-E (Mansky et al., 2002a), están implicados en el proceso de diferenciación y maduración de los precursores de este tipo celular. Por otra parte, otros factores de la subfamilia MiT, en concreto TFE3 y TFEB, actúan como inductores positivos del gen *CDHI*, a través de su interacción con la caja E3 del promotor en fibroblastos murinos, y al igual que sucede con MITF-H, la expresión de los factores TFE3 y TFEB en células MDCK parentales, no induce la regulación positiva del promotor de cadherina-E (Huan et al., 2005).

Mutaciones en la caja E3 del promotor impiden la regulación positiva del gen *CDHI* humano por MITF-H, en células MDCK-Snail y en menor medida en MDCK-Slug (Fig.16B y C). Sin embargo, en las células MDCK-E47, la mutación en la caja E3 del promotor no impide de forma significativa la activación del promotor, observándose, de hecho, una moderada activación del promotor de cadherina-E mutado en la caja E3 en presencia de MITF-H (Fig.16D). Esto podría ser debido a la implicación de la caja E1 en la activación del promotor de cadherina-E por MITF-H. De hecho, en células MDCK-E47, la mutación en la caja E1 del promotor bloquea parcialmente su activación por MITF-H, a diferencia de lo observado en células MDCK-Snail y -Slug. Estos resultados indican la existencia de mecanismos distintos en el proceso de activación de cadherina-E, por parte de MITF-H, en el modelo celular MDCK, en función de la expresión de diferentes represores (Snail o bHLH).

Adicionalmente, la mutación simultánea de las cajas E1 y E3, mostraba una fuerte desrepresión de la actividad basal del promotor de cadherina-E, en las tres líneas derivadas de MDCK, pudiendo ser

debida, en parte, a que ninguno de los represores (Snail, Slug o E47) es capaz de unirse al promotor mutado. Sin embargo, curiosamente, esta desrepresión era bloqueada significativamente en presencia de MITF-H en los tres tipos celulares. Este hecho podría sugerir la existencia de mecanismos de competición de MITF-H con otros factores reguladores endógenos. Así, la mutación en ambas cajas E del promotor de cadherina-E, impediría la unión de MITF-H al promotor, favoreciendo la unión de factores endógenos a las cajas E mutadas o a otras regiones del promotor (Fig.36).

En el caso de las líneas tumorales humanas MDA-MB435 y A375P, la mutación de la caja E3 impedía la activación del promotor de cadherina-E por MITF-H, mientras que la caja E1 no parece estar implicada en el proceso (Fig.17B). Además, y al contrario de lo sucedido en el modelo MDCK, en las líneas humanas, la mutación simultánea de las cajas E1 y E3 del promotor de cadherina-E, no afectaban a la activación de MITF-H sobre el promotor de cadherina-E. Este hecho sugiere que la expresión de MITF-H además de controlar positivamente el promotor, podría estar actuando de forma directa o indirecta sobre otros reguladores positivos del promotor de cadherina-E, que impedirían la represión del promotor conteniendo las dos cajas E mutadas (Fig.36). Es interesante mencionar que la modulación de reguladores positivos de cadherina-E ha sido descrita para otros factores de la subfamilia MiT (TFEB y TFE3). Así, la mutación en la caja E3 reduce significativamente el grado de activación del promotor de cadherina-E por parte de ambos factores, en fibroblastos murinos, si bien no se anula por completo, debido a que la expresión de TFE3 y TFEB induce la expresión del factor WT1 (Huan et al., 2005), descrito anteriormente como un activador del promotor de cadherina-E (Hosono et al., 2000).



**Fig. 36. Modelo propuesto para la activación de cadherina por MITF-H.** **A** MITF-H activa el promotor de cadherina-E humano a través de su interacción con la caja E3. Únicamente para el caso de las células MDCK-E47, se requiere la colaboración de la caja E1, además de la caja E3 en la regulación de cadherina-E. **B** Mecanismo de competición entre MITF-H y distintos factores reguladores de cadherina-E, en la regulación de la expresión de cadherina-E. La mutación de ambas cajas E, impide la unión de MITF-H al promotor, favoreciendo la unión de factores endógenos con las cajas E mutadas o a otras regiones. A su vez, la presencia de MITF-H en el núcleo, podría estar compitiendo con estos factores en la regulación de cadherina-E.

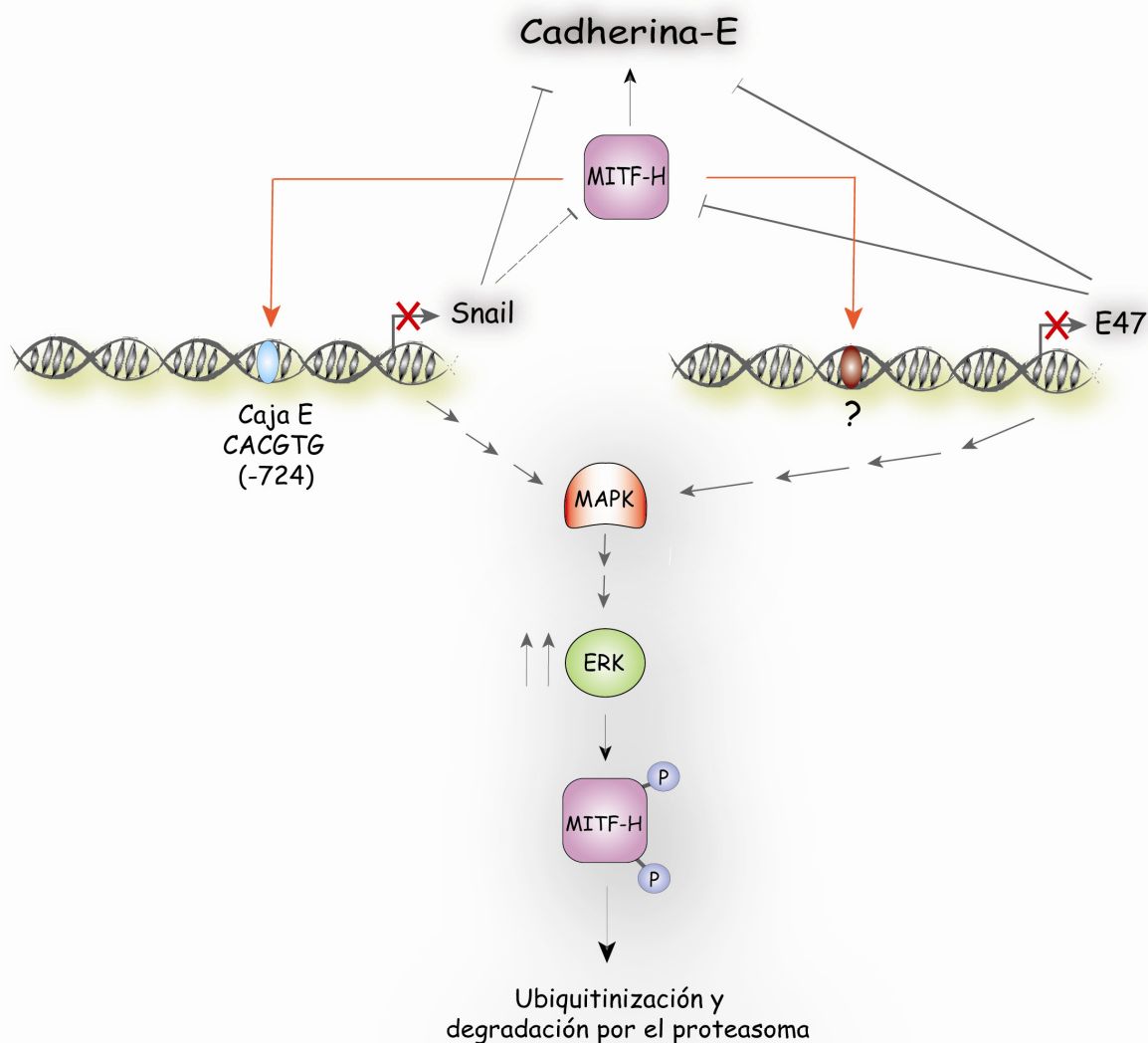
### 3. Regulación de los factores Snail, Slug y E47 en presencia de MITF-H

Los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de este trabajo, habían mostrado la implicación de los factores Snail, Slug y E47 en la represión transcripcional del gen de *MITF-H*, así como la participación de éste en la regulación positiva del gen *CDHI* (Fig. 37 y 38). Estudios previos habían descrito que Slug era una diana génica de MITF-M durante la diferenciación y maduración de melanocitos (Sanchez-Martin et al., 2002). Por otra parte, otros datos de la literatura, relacionaban la expresión de factores de la subfamilia MiT, con la regulación negativa de Snail. En concreto, los factores TFE3 y TFEB se habían descrito como capaces de reprimir la expresión de Snail cuando se sobreexpresan en fibroblastos de ratón (Huan et al., 2005). Estas observaciones y la existencia de potenciales cajas E reconocibles por factores MITF, en los promotores de Snail y E2A (promotor del gen que codifica para E47 y E12), sugerían la posibilidad de que MITF-H pudiera estar controlando la expresión de estos factores. Los ensayos de actividad promotora mostraron, efectivamente, la capacidad de MITF-H de regular negativamente la actividad de los promotores de Snail y E2A, en células MDCK parentales. Adicionalmente, en el caso del promotor de E2A indicaron el requerimiento de secuencias contenidas en el promotor de ~ 2,3Kb, y ausentes en el promotor de ~ 400pb, para su represión por parte de MITF-H (Fig.18). Cabe destacar, que el posterior análisis bioinformático del promotor de E2A, reveló varias cajas E, ausentes en el promotor corto (~ 400pb) de E2A, como posibles dianas génicas de MITF.

Los estudios de ganancia de función de MITF-H en células MDCK-E47, MDA-MB435 y A375P, permitieron confirmar la represión de Snail y de E47, por parte de MITF-H, tanto a nivel transcripcional como a nivel de proteína, (Fig.23 y Fig.28 y datos no mostrados). Adicionalmente, en la línea MDA-MB435 con expresión estable de EGFP-MITFH, los ensayos de actividad del promotor de Snail humano con distintas delecciones y mutaciones en las cajas E1/E2, indicaron el requerimiento de la caja E1 en posición -724, para la regulación negativa del promotor por parte de MITF-H (Fig.29C, D, E y F). Finalmente los ensayos de *ChIP*, confirmaron la interacción *in vivo* de MITF-H a la región que contiene la caja E1 (-724) del promotor de Snail humano en células MDA-MB435 (Fig.30).

Todos estos resultados indican de forma clara la regulación negativa de la expresión de Snail y E47 por MITF-H. Estos resultados, junto al hecho de que la isoforma H de MITF se encontrase reprimida en las líneas MDCK-Snail y -E47, apoyan la existencia de un mecanismo de regulación *feed-back* negativo, entre los factores Snail, E47 y MITF-H. De esta forma, MITF-H podría reprimir la expresión de los factores Snail y E47, impidiendo así su acción represora sobre MITF-H, lo que permitiría a la célula mantener un nivel de expresión alto de MITF-H que, a su vez, podría contribuir a mantener la activación del promotor de cadherina-E. Por su parte, los represores Snail y E47, actuarían regulando negativamente la expresión de MITF-H, lo que impide la activación de la expresión de cadherina-E, proporcionando un mecanismo adicional a la represión directa que ejercen ambos factores sobre el promotor de cadherina-E (Fig.37).

Adicionalmente, estudios de estabilidad proteica indicaban la existencia de potenciales mecanismos de desestabilización de Snail y E47 por MITF-H y viceversa (resultados no mostrados). Estos resultados preliminares podrían estar relacionados con la vía de ERK/MAPK observada en células MDCK con expresión estable de Snail y E47 (Jorda et al., 2005; Jorda et al., 2007) y en la demostrada capacidad de ERK de interaccionar y fosforilar a MITF-M de forma directa, señalándolo para su degradación a través del proteasoma (Hemesath et al., 1998; Molina et al., 2005; Price et al., 1998a; Sato et al., 1997; Wu et al., 2000), sugiriendo un posible modelo de regulación dual de MITF-H por parte de Snail y E47 (Fig.37).



**Fig. 37 Modelo de regulación *feed-back* negativo propuesto para los factores Snail, Slug y E47.** Representación esquemática de la regulación existente entre los factores indicados. MITF-H reprime de forma directa la expresión de Snail y de E47. Estos factores a su vez, aumentan los niveles de ERK activo en la célula favoreciendo la fosforilación y degradación de MITF-H por el proteasoma

En resumen, el hecho de que la isoforma H de MITF, se encuentre reprimida en las líneas con expresión de los factores Snail y E47, y a su vez MITF-H regule negativamente a ambos factores, apoya un posible mecanismo de regulación *feed-back* negativo entre los factores MITF-H, Snail y E47 (Figs. 37 y 38).

#### 4. **Papel de MITF-H durante la TEM y su relación con los factores Snail, Slug y E47**

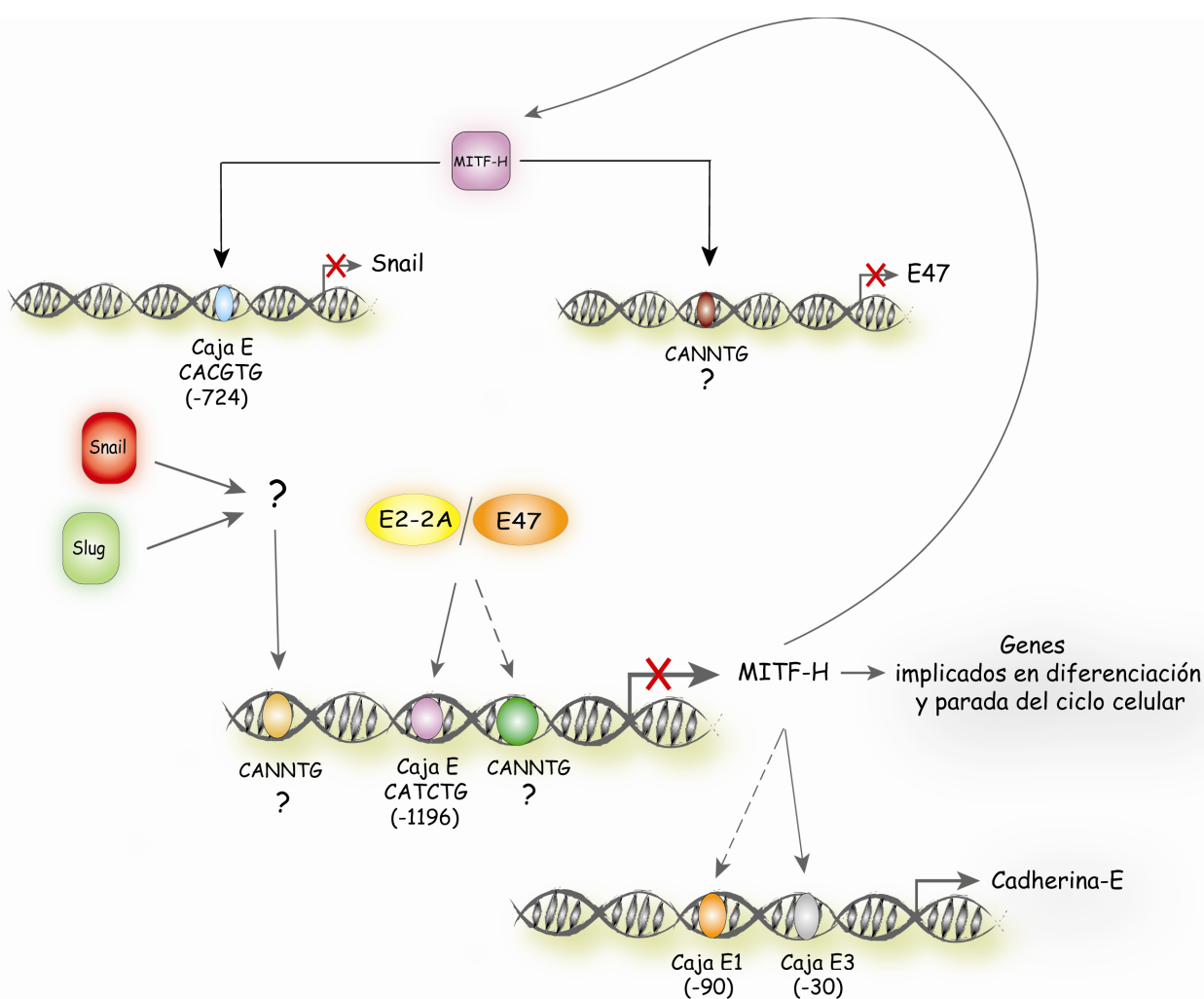
Uno de los objetivos principales de este trabajo, se centraba en el estudio de la implicación de MITF-H durante la TEM inducida por Snail, Slug y E47. Los estudios de ganancia de función de la isoforma H de MITF en el modelo MDCK (MDCK-Snail, -Slug y -E47) y en las líneas humanas MDA-MB435 y A375P, nos permitieron estudiar el papel de MITF-H y su relación con distintos marcadores durante este proceso. Curiosamente, de todos los clones obtenidos en el modelo celular MDCK, sólo los derivados de células MDCK-E47 mostraron una transición del fenotipo fibroblástico a un fenotipo más epiteloide (Fig.19), asociado a la capacidad de re-expresar cadherina-E en los contactos célula-célula, así como un aumento de marcadores epiteliales y la pérdida parcial de marcadores mesenquimáticos (Fig.20), indicando la existencia de un proceso de transición mesénquima-epitelio (TME) en estas células. Asimismo, los experimentos de ganancia de función de MITF-H en células MDCK-E47, pudieron confirmar la activación transcripcional de la cadherina-E (Fig.22A) y el requerimiento de la caja E3 de su promotor en el proceso (Fig.22B). Al igual que los resultados obtenidos tras la sobreexpresión transitoria de MITF-H en células MDCK-E47, la expresión estable del factor, mostraba posibles mecanismos de competición entre MITF-H y otros reguladores de cadherina-E endógenos. Igualmente, pudimos corroborar los datos de represión de los factores Snail y E47 endógenos inducidos por MITF-H (Fig.23).

En resumen, todos estos resultados sugerían un papel relevante para MITF-H, como modulador negativo del proceso de TEM, inducido por el factor E47 en células MDCK.

Resultados similares, en cuanto a la regulación transcripcional y re-expresión de cadherina-E, fueron obtenidos en los clones derivados de la línea celular MDA-MB435 con expresión estable de EGFP-MITFH. Así, los niveles de expresión de Snail y E47 estaban disminuidos con respecto a las células control (Fig.28 y datos no mostrados), aunque no se observaron cambios en los niveles de expresión de algunos marcadores mesenquimáticos (fibronectina) o epiteliales (plakoglobina y  $\beta$ -catenina). Curiosamente, si se detectó la disminución de la expresión de cadherina-N (Fig.26), al igual que en otras líneas celulares con expresión estable de MITF-H (MDCK-Snail, -Slug y -E47, así como en A375P). Estos resultados, por tanto, indican la existencia de mecanismos y/o genes diana comunes a la acción de MITF-H en distintos tipos celulares, así como otros específicos del contextos celular.

Cabe destacar, que MITF ha sido descrito como un factor clave en la diferenciación de varios tipos celulares. Mediante el control de genes específicos, MITF regula la maduración de células como melanocitos (Hodgkinson et al., 1993; Steingrímsson et al., 2004), osteoclastos (Mansky et al., 2002a) y mastocitos, entre otros. Así como la expresión de MITF se relaciona con la parada del ciclo celular y la posterior diferenciación en varios tipos celulares, la represión del factor podría estar relacionada con la dediferenciación celular que sucede en muchas células tumorales. El hecho de que tanto MITF-M como otros factores de la subfamilia MiT, estén implicados en la activación de cadherina-E (Huan et al.,

2005; Mansky et al., 2002a) y otros genes implicados en diferenciación (*TYR*, *TYRP1* y *TYRP2* en melanocitos; *TRAP* o *cathepsina K* en osteoclastos, entre otros) apoyan esta hipótesis. De hecho, como se mencionó anteriormente, la expresión de TFE3 y/o TFEB induce tanto la expresión de cadherina-E como de su regulador positivo WT1, acompañado de la represión del factor Snail y de marcadores mesenquimáticos como vimentina, apoyando su implicación en procesos de TME (Huan et al., 2005). Estos hallazgos y el hecho de que se hayan descrito papeles redundantes para los factores de la subfamilia MiT en determinados procesos celulares (Steingrímsson et al., 2002), refuerzan nuestros resultados.



**Fig. 38 Modelo de actuación propuesto para de MITF-H y su relación con factores de la familia Snail y bHLH.** Snail, Slug y los factores bHLH, E47 y E2-2A, reprimen la expresión de MITF-H. Para el caso de E2-2A y E47, regulan de forma directa el promotor de MITF-H. Los factores Snail y Slug, actúan de forma indirecta sobre la regulación negativa de MITF-H. Todo ello impediría la regulación positiva que ejerce MITF-H sobre el promotor de cadherina-E y la activación de genes diana de MITF-H implicados en diferenciación celular. A su vez, por un mecanismo de regulación *feed-back* negativo, MITF-H, es capaz de reprimir de forma directa, tanto a Snail como a E47.



## 5. Estudios *in vivo* del papel de MITF-H durante la progresión tumoral

Durante los últimos años, MITF-M se ha descrito como un factor cuya expresión en melanomas varía dependiendo del tipo y del grado de progresión del tumor (McGill et al., 2002; Miller et al., 2004; Steingrimsdóttir et al., 2004). Por una parte, MITF-M se ha descrito como factor responsable del cambio morfológico de célula epitelial a célula fibroblastoide en determinadas líneas celulares de melanomas (McGill et al., 2002), así como inductor de protooncogenes como *c-MET* (McGill et al., 2006) y factores antiapoptóticos como Bcl2 (McGill et al., 2002), lo que promueve la supervivencia y aumenta el potencial metastático de los melanomas. Sin embargo, otros estudios sobre el patrón de expresión de la isoforma M durante la progresión tumoral, sugieren que tanto MITF como sus genes diana, son fuertemente reprimidos a medida que avanza el melanoma (Miller et al., 2004; Salti et al., 2000), con excepción de aquellos casos en donde MITF-M se encuentra amplificado (Selzer et al., 2002). Por otra parte, investigaciones recientes muestran la relación inversa entre la expresión de MITF-M y la agresividad de distintas líneas de melanoma, con una notable reducción tanto en el crecimiento de los tumores generados, como su potencial metastático (Lekmine et al., 2007; Selzer et al., 2002). Estos hallazgos, han conducido a una controversia sobre el papel de MITF-M como un oncogén, postulado anteriormente, ya que, por una parte, muestra actividades biológicas asociadas a la estimulación y supervivencia de los tumores y, por otra, está implicado en la inhibición del crecimiento de células y tumores de melanoma. En este contexto, nuestros resultados con las células MDA-MB435 muestran que la expresión estable de MITF-H induce una reducción significativa tanto en el tamaño como en el crecimiento de los tumores generados por estas células (MDA-MB435-EGFP-MITFH), que a su vez se asocia con una notable represión de los marcadores Snail, Slug y E47 en la mayoría de los casos analizados. Esto último, explicaría parcialmente la re-expresión de cadherina-E observada tanto a nivel de mRNA (RT-PCR), como a nivel de proteína (inmunohistoquímica), en los tumores generados por las células MDA-MB435 con expresión estable de EGFP-MITFH, con respecto a los tumores inducidos por las células MDA-MB435 control (carentes de expresión de cadherina-E).

La notable disminución de la proliferación celular observada en las células MDA-MB435-EGFP-MITFH en cultivo, podría ser una de las causas que explicarían la reducción del crecimiento de los tumores. Resultados similares, que evidencian el papel de MITF-H como regulador negativo de la proliferación celular, fueron confirmados en clones generados a partir de las células MDCK-Snail, -Slug y -E47, y en A375P, con expresión estable de MITF-H (datos no mostrados). Adicionalmente, el estudio histológico de los tumores extirpados, derivados de las células MDA-MB435 con expresión estable de EGFP-MITFH, indicó un aumento general en la apoptosis, así como la presencia, en determinados tumores, de células con estructuras más redondeadas y menos alargadas, en contraste con los tumores control, formados principalmente por células con estructuras fusiformes. Estos datos, por tanto, sugerían la inducción de un fenotipo tumoral más diferenciado por la expresión de MITF-H. Estas evidencias también han sido observadas en melanomas cutáneos, en donde la sobreexpresión de

MITF-M, afecta el fenotipo de las células y sugiere una mayor diferenciación de los tumores con alta expresión de MITF-M (Lekmine et al., 2007).

Estos resultados, apoyan la relación entre la capacidad del factor MITF de frenar la proliferación celular, con la inducción de diferenciación celular. De hecho, esto se ha podido confirmar en diferentes estudios en melanocitos que relacionan la expresión de MITF-M con el aumento de células en fase G2, (a través de la activación de controladores negativos del ciclo celular (p21y p27)), y en fase G1 (mediante la regulación positiva de CDK2, p21 e INK4a, este último frecuentemente inactivo en melanomas) (Carreira et al., 2005; Du et al., 2004; Lekmine et al., 2007; Loercher et al., 2005).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis, relacionan por primera vez la isoforma H de MITF con el proceso tumoral y con factores inductores de TEM como Snail, Slug y E47, abriendo así una nueva vía en cuanto a la implicación de otras isoformas de MITF, alternativas a MITF-M, en tumores diferentes a melanomas. De hecho, existen datos sobre la expresión de MITF-A en células de melanoma y su expresión mantenida durante la progresión de este tipo tumoral (Miller et al., 2004). Estos hallazgos sugieren que la expresión diferencial de las distintas isoformas de MITF podría influir en el fenotipo y características de crecimiento del tumor (Salti et al., 2000; Selzer et al., 2002).

## ***CONCLUSIONES***



1. MITF-H es la isoforma específica del factor MITF que se encuentra reprimida en células MDCK que sobreexpresan establemente los factores Snail, Slug y E47, así como en las líneas humanas de carcinoma de mama MDA-MB231, MDA-MB435, y de melanoma A375P.
2. El promotor de MITF-H se encuentra reprimido en células MDCK-Snail, MDCK-Slug y MDCK-E47, y en las líneas humanas MDA-MB231, MDA-MB435 y A375P.
3. Los factores bHLH de clase I, E47 y E2-2A, reprimen de forma directa la expresión de MITF-H, habiendo demostrado la interacción *in vivo* de E47, a la región que contiene la caja E en la posición -1196 del promotor de MITF-H.
4. La expresión de MITF-H en las células MDCK-Snail, -Slug y -E47, y en las líneas tumorales humanas MDA-MB435 y A375P, desreprime la expresión de cadherina-E, a nivel transcripcional. La activación del promotor de cadherina-E mediada por MITF-H, requiere la integridad de la caja E3 (-30) del promotor de cadherina-E humano.
5. El factor MITF-H regula negativamente la expresión de los factores Snail y E47 en distintos sistemas celulares. Estos resultados sugieren un mecanismo de regulación *feed-back* negativo entre los factores MITF-H, Snail y E47, habiendo demostrado la interacción *in vivo* de MITF-H a la región que contiene la caja E, en la posición -724 del promotor de Snail, en células MDA-MB435.
6. La expresión estable de MITF-H en células MDCK-E47, induce una reversión parcial de la transición epitelio-mesénquima inducida por E47, aumentando la expresión y organización de marcadores epiteliales y originando la pérdida de marcadores mesenquimáticos.
7. La expresión estable de MITF-H en la línea desdiferenciada de carcinoma de mama, MDA-MB435, induce la disminución del crecimiento tumoral, asociado a la re-expresión de cadherina-E y a la represión de los factores Snail, Slug y E47.
8. En conjunto, los datos aportados indican que MITF-H actúa como regulador positivo del fenotipo epitelial, por lo que su modulación negativa, por los factores Snail y bHLH, puede suponer un mecanismo adicional a la progresión tumoral.



## ***BIBLIOGRAFÍA***





- Amae, S., Fuse, N., Yasumoto, K., Sato, S., Yajima, I., Yamamoto, H., Udono, T., Durlu, Y.K., Tamai, M., Takahashi, K. and Shibahara, S. (1998) Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 710-715.
- Amiel, J., Watkin, P.M., Tassabehji, M., Read, A.P. and Winter, R.M. (1998) Mutation of the MITF gene in albinism-deafness syndrome (Tietz syndrome). *Clin Dysmorphol*, **7**, 17-20.
- Argani, P. and Ladanyi, M. (2003) Recent advances in pediatric renal neoplasia. *Adv Anat Pathol*, **10**, 243-260.
- Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A. and Walker, M.D. (1993a) Cell-specific expression of helix-loop-helix transcription factors encoded by the E2A gene. *Nucleic Acids Res*, **21**, 1601-1606.
- Aronheim, A., Shiran, R., Rosen, A. and Walker, M.D. (1993b) The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8063-8067.
- Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M. and et al. (1994) E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*, **79**, 885-892.
- Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M.A. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, **132**, 3151-3161.
- Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herreros, A. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*, **2**, 84-89.
- Behrens, J. (1999) Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*, **18**, 15-30.
- Behrens, J., Frixen, U., Schipper, J., Weidner, M. and Birchmeier, W. (1992) Cell adhesion in invasion and metastasis. *Semin Cell Biol*, **3**, 169-178.
- Behrens, J., Lowrick, O., Klein-Hitpass, L. and Birchmeier, W. (1991) The E-cadherin promoter: functional analysis of a G.C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11495-11499.
- Bentley, N.J., Eisen, T. and Goding, C.R. (1994) Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol Cell Biol*, **14**, 7996-8006.
- Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T.J., Bille, K., Fisher, D.E., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (1998) Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J Cell Biol*, **142**, 827-835.
- Birchmeier, W. and Behrens, J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, **1198**, 11-26.
- Bismuth, K., Maric, D. and Arnheiter, H. (2005) MITF and cell proliferation: the role of alternative splice forms. *Pigment Cell Res*, **18**, 349-359.
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M.A., Fraga, M.F., Esteller, M. and Cano, A. (2003) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J Cell Sci*, **116**, 499-511.

- Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D.E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., Wegner, M. and Goossens, M. (2000) Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet*, **9**, 1907-1917.
- Boyer, B., Valles, A.M. and Edme, N. (2000) Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol*, **60**, 1091-1099.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R. and Kirchner, T. (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10356-10361.
- Braga, V.M. (1999) Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Mol Pathol*, **52**, 197-202.
- Braga, V.M. (2002) Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 546-556.
- Busca, R. and Ballotti, R. (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*, **13**, 60-69.
- Busca, R., Berra, E., Gaggioli, C., Khaled, M., Bille, K., Marchetti, B., Thyss, R., Fitsialos, G., Larribere, L., Bertolotto, C., Virolle, T., Barbry, P., Pouyssegur, J., Ponzio, G. and Ballotti, R. (2005) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J Cell Biol*, **170**, 49-59.
- Busca, R., Bertolotto, C., Abbe, P., Englaro, W., Ishizaki, T., Narumiya, S., Boquet, P., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (1998) Inhibition of Rho is required for cAMP-induced melanoma cell differentiation. *Mol Biol Cell*, **9**, 1367-1378.
- Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F. and Nieto, M.A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, **2**, 76-83.
- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S.A., Galibert, M.D., Denat, L., Larue, L. and Goding, C.R. (2005) Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*, **433**, 764-769.
- Castanon, I. and Baylies, M.K. (2002) A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene*, **287**, 11-22.
- Caulin, C., Lopez-Barcons, L., Gonzales-Garrigues, M., Navarro, P., Lozano, E., Rodrigo, I., Gamallo, C., Cano, A., Fabra, A. and Quintanilla, M. (1996) Suppression of the metastatic phenotype of a mouse skin carcinoma cell line independent of E-cadherin expression and correlated with reduced Ha-ras oncogene products. *Mol Carcinog*, **15**, 104-114.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D. and van Roy, F. (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*, **7**, 1267-1278.
- Corneliussen, B., Thornell, A., Hallberg, B. and Grundstrom, T. (1991) Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers. *J Virol*, **65**, 6084-6093.
- Chappuis-Flament, S., Wong, E., Hicks, L.D., Kay, C.M. and Gumbiner, B.M. (2001) Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *J Cell Biol*, **154**, 231-243.

- Christiansen, J.J. and Rajasekaran, A.K. (2006) Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, **66**, 8319-8326.
- Christofori, G.a. and Semb, H. (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, **24**, 73-76.
- Davis, R.L., Cheng, P.F., Lassar, A.B. and Weintraub, H. (1990) The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell*, **60**, 733-746.
- Day, M.L., Zhao, X., Vallorosi, C.J., Putzi, M., Powell, C.T., Lin, C. and Day, K.C. (1999) E-cadherin mediates aggregation-dependent survival of prostate and mammary epithelial cells through the retinoblastoma cell cycle control pathway. *J Biol Chem*, **274**, 9656-9664.
- Dorsky, R.I., Moon, R.T. and Raible, D.W. (1998) Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature*, **396**, 370-373.
- Du, J. and Fisher, D.E. (2002) Identification of Aim-1 as the underwhite mouse mutant and its transcriptional regulation by MITF. *J Biol Chem*, **277**, 402-406.
- Du, J., Miller, A.J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S. and Fisher, D.E. (2003) MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol*, **163**, 333-343.
- Du, J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W.E., Nishimura, E.K., Golub, T.R. and Fisher, D.E. (2004) Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell*, **6**, 565-576.
- Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H. and Foisner, R. (2005) DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, **24**, 2375-2385.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M. and Harrison, S.C. (1994) Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev*, **8**, 970-980.
- Ephrussi, A., Church, G.M., Tonegawa, S. and Gilbert, W. (1985) B lineage--specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science*, **227**, 134-140.
- Fagotto, F., Funayama, N., Gluck, U. and Gumbiner, B.M. (1996) Binding to cadherins antagonizes the signaling activity of beta-catenin during axis formation in *Xenopus*. *J Cell Biol*, **132**, 1105-1114.
- Faraldo, M.L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. and Cano, A. (1997) Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*, **20**, 33-47.
- Fournier, C., Goto, Y., Ballestar, E., Delaval, K., Hever, A.M., Esteller, M. and Feil, R. (2002) Allele-specific histone lysine methylation marks regulatory regions at imprinted mouse genes. *Embo J*, **21**, 6560-6570.
- Furumura, M., Potterf, S.B., Toyofuku, K., Matsunaga, J., Muller, J. and Hearing, V.J. (2001) Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. *J Biol Chem*, **276**, 28147-28154.
- Fuse, N., Hirose, S. and Hayashi, S. (1994) Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev*, **8**, 2270-2281.

- Fuse, N., Yasumoto, K., Suzuki, H., Takahashi, K. and Shibahara, S. (1996) Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **219**, 702-707.
- Fuse, N., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Yoshizawa, M., Udono, T., Takahashi, K., Tamai, M., Tomita, Y., Tachibana, M. and Shibahara, S. (1999) Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *J Biochem (Tokyo)*, **126**, 1043-1051.
- Gamallo, C., Palacios, J., Suarez, A., Pizarro, A., Navarro, P., Quintanilla, M. and Cano, A. (1993) Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol*, **142**, 987-993.
- Garraway, L.A., Weir, B.A., Zhao, X., Widlund, H., Beroukhim, R., Berger, A., Rimm, D., Rubin, M.A., Fisher, D.E., Meyerson, M.L. and Sellers, W.R. (2005a) "Lineage addiction" in human cancer: lessons from integrated genomics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **70**, 25-34.
- Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhim, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., Lee, C., Wagner, S.N., Li, C., Golub, T.R., Rimm, D.L., Meyerson, M.L., Fisher, D.E. and Sellers, W.R. (2005b) Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, **436**, 117-122.
- Goding, C.R. (2000) Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev*, **14**, 1712-1728.
- Gotzmann, J., Mikula, M., Eger, A., Schulte-Hermann, R., Foisner, R., Beug, H. and Mikulits, W. (2004) Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res*, **566**, 9-20.
- Granter, S.R., Weilbaecher, K.N., Quigley, C. and Fisher, D.E. (2002) Role for microphthalmia transcription factor in the diagnosis of metastatic malignant melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, **10**, 47-51.
- Granter, S.R., Weilbaecher, K.N., Quigley, C., Fletcher, C.D. and Fisher, D.E. (2001) Microphthalmia transcription factor: not a sensitive or specific marker for the diagnosis of desmoplastic melanoma and spindle cell (non-desmoplastic) melanoma. *Am J Dermatopathol*, **23**, 185-189.
- Greenburg, G. and Hay, E.D. (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*, **95**, 333-339.
- Grooteclaes, M.L. and Frisch, S.M. (2000) Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, **19**, 3823-3828.
- Gumbiner, B.M. (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 622-634.
- Hajra, K.M., Chen, D.Y. and Fearon, E.R. (2002) The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Res*, **62**, 1613-1618.
- Hajra, K.M. and Fearon, E.R. (2002) Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 255-268.
- Hallsson, J.H., Favor, J., Hodgkinson, C., Glaser, T., Lamoreux, M.L., Magnusdottir, R., Gunnarsson, G.J., Sweet, H.O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Steingrimsson, E. (2000) Genomic, transcriptional and mutational analysis of the mouse microphthalmia locus. *Genetics*, **155**, 291-300.

- Hemavathy, K., Ashraf, S.I. and Ip, Y.T. (2000a) Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, **257**, 1-12.
- Hemavathy, K., Guru, S.C., Harris, J., Chen, J.D. and Ip, Y.T. (2000b) Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription. *Mol Cell Biol*, **20**, 5087-5095.
- Hemesath, T.J., Price, E.R., Takemoto, C., Badalian, T. and Fisher, D.E. (1998) MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, **391**, 298-301.
- Hemesath, T.J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M.J., Vaught, J., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Fisher, D.E. (1994) microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev*, **8**, 2770-2780.
- Hennig, G., Lowrick, O., Birchmeier, W. and Behrens, J. (1996) Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J Biol Chem*, **271**, 595-602.
- Henthorn, P., McCarrick-Walmsley, R. and Kadesch, T. (1990) Sequence of the cDNA encoding ITF-2, a positive-acting transcription factor. *Nucleic Acids Res*, **18**, 678.
- Hershey, C.L. and Fisher, D.E. (2004) Mitf and Tfe3: members of a b-HLH-ZIP transcription factor family essential for osteoclast development and function. *Bone*, **34**, 689-696.
- Hershey, C.L. and Fisher, D.E. (2005) Genomic analysis of the Microphthalmia locus and identification of the MITF-J/Mitf-J isoform. *Gene*, **347**, 73-82.
- Hirano, S., Kimoto, N., Shimoyama, Y., Hirohashi, S. and Takeichi, M. (1992) Identification of a neural alpha-catenin as a key regulator of cadherin function and multicellular organization. *Cell*, **70**, 293-301.
- Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Arnheiter, H. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, **74**, 395-404.
- Hosono, S., Gross, I., English, M.A., Hajra, K.M., Fearon, E.R. and Licht, J.D. (2000) E-cadherin is a WT1 target gene. *J Biol Chem*, **275**, 10943-10953.
- Huan, C., Sashital, D., Hailemariam, T., Kelly, M.L. and Roman, C.A. (2005) Renal carcinoma-associated transcription factors TFE3 and TFEB are leukemia inhibitory factor-responsive transcription activators of E-cadherin. *J Biol Chem*, **280**, 30225-30235.
- Huang, X. and Saint-Jeannet, J.P. (2004) Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Dev Biol*, **275**, 1-11.
- Inukai, T., Inoue, A., Kurosawa, H., Goi, K., Shinjyo, T., Ozawa, K., Mao, M., Inaba, T. and Look, A. (1999) SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell*, **4**, 343-352.
- Jacquemin, P., Lannoy, V.J., O'Sullivan, J., Read, A., Lemaigre, F.P. and Rousseau, G.G. (2001) The transcription factor onecut-2 controls the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 1200-1205.
- Janku, F., Novotny, J., Julis, I., Julisova, I., Pecen, L., Tomancova, V., Kocmanova, G., Krasna, L., Krajsova, I., Stork, J. and Petruzalka, L. (2005) KIT receptor is expressed in more than 50% of early-stage malignant melanoma: a retrospective study of 261 patients. *Melanoma Res*, **15**, 251-256.

- Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, **73**, 355-382.
- Jorda, M., Olmeda, D., Vinyals, A., Valero, E., Cubillo, E., Llorens, A., Cano, A. and Fabra, A. (2005) Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci*, **118**, 3371-3385.
- Jorda, M., Vinyals, A., Marazuela, A., Cubillo, E., Olmeda, D., Valero, E., Cano, A. and Fabra, A. (2007) Id-1 is induced in MDCK epithelial cells by activated Erk/MAPK pathway in response to expression of the Snail and E47 transcription factors. *Exp Cell Res*, **313**, 2389-2403.
- Kandikonda, S., Oda, D., Niederman, R. and Sorkin, B.C. (1996) Cadherin-mediated adhesion is required for normal growth regulation of human gingival epithelial cells. *Cell Adhes Commun*, **4**, 13-24.
- Kataoka, H., Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S. and Kita, T. (2000) A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res*, **28**, 626-633.
- Kee, B.L. and Murre, C. (1998) Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J Exp Med*, **188**, 699-713.
- Kiledjian, M., Su, L.K. and Kadesch, T. (1988) Identification and characterization of two functional domains within the murine heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol*, **8**, 145-152.
- King, R., Weilbaecher, K.N., McGill, G., Cooley, E., Mihm, M. and Fisher, D.E. (1999) Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for MelanomaDiagnosis. *Am J Pathol*, **155**, 731-738.
- Knudsen, K.A., Soler, A.P., Johnson, K.R. and Wheelock, M.J. (1995) Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol*, **130**, 67-77.
- Kolligs, F.T., Nieman, M.T., Winer, I., Hu, G., Van Mater, D., Feng, Y., Smith, I.M., Wu, R., Zhai, Y., Cho, K.R. and Fearon, E.R. (2002) ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell*, **1**, 145-155.
- Kuiper, R.P., Schepens, M., Thijssen, J., Schoenmakers, E.F. and van Kessel, A.G. (2004) Regulation of the MITF/TFE bHLH-LZ transcription factors through restricted spatial expression and alternative splicing of functional domains. *Nucleic Acids Res*, **32**, 2315-2322.
- Lang, D., Lu, M.M., Huang, L., Engleka, K.A., Zhang, M., Chu, E.Y., Lipner, S., Skoultschi, A., Millar, S.E. and Epstein, J.A. (2005) Pax3 functions at a nodal point in melanocyte stem cell differentiation. *Nature*, **433**, 884-887.
- Larribere, L., Hilmi, C., Khaled, M., Gaggioli, C., Bille, K., Auberger, P., Ortonne, J.P., Ballotti, R. and Bertolotto, C. (2005) The cleavage of microphthalmia-associated transcription factor, MITF, by caspases plays an essential role in melanocyte and melanoma cell apoptosis. *Genes Dev*, **19**, 1980-1985.
- Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M. and Kemler, R. (1996) A role for cadherins in tissue formation. *Development*, **122**, 3185-3194.
- Lassar, A.B., Buskin, J.N., Lockshon, D., Davis, R.L., Apone, S., Hauschka, S.D. and Weintraub, H. (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, **58**, 823-831.

- Leckband, D. and Sivasankar, S. (2000) Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 587-592.
- Lee, J.M., Dedhar, S., Kalluri, R. and Thompson, E.W. (2006) The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*, **172**, 973-981.
- Lee, M., Goodall, J., Verastegui, C., Ballotti, R. and Goding, C.R. (2000) Direct regulation of the Microphthalmia promoter by Sox10 links Waardenburg-Shah syndrome (WS4)-associated hypopigmentation and deafness to WS2. *J Biol Chem*, **275**, 37978-37983.
- Lekmine, F., Chang, C.K., Sethakorn, N., Das Gupta, T.K. and Salti, G.I. (2007) Role of microphthalmia transcription factor (Mitf) in melanoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **354**, 830-835.
- Levy, C., Khaled, M. and Fisher, D.E. (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*, **12**, 406-414.
- Levy, C., Nechushtan, H. and Razin, E. (2002) A new role for the STAT3 inhibitor, PIAS3: a repressor of microphthalmia transcription factor. *J Biol Chem*, **277**, 1962-1966.
- Loercher, A.E., Tank, E.M., Delston, R.B. and Harbour, J.W. (2005) MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol*, **168**, 35-40.
- Lozano, E. and Cano, A. (1998) Cadherin/catenin complexes in murine epidermal keratinocytes: E-cadherin complexes containing either beta-catenin or plakoglobin contribute to stable cell-cell contacts. *Cell Adhes Commun*, **6**, 51-67.
- Luchin, A., Purdom, G., Murphy, K., Clark, M.Y., Angel, N., Cassady, A.I., Hume, D.A. and Ostrowski, M.C. (2000) The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts. *J Bone Miner Res*, **15**, 451-460.
- Mansky, K.C., Marfatia, K., Purdom, G.H., Luchin, A., Hume, D.A. and Ostrowski, M.C. (2002a) The microphthalmia transcription factor (MITF) contains two N-terminal domains required for transactivation of osteoclast target promoters and rescue of mi mutant osteoclasts. *J Leukoc Biol*, **71**, 295-303.
- Mansky, K.C., Sankar, U., Han, J. and Ostrowski, M.C. (2002b) Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *J Biol Chem*, **277**, 11077-11083.
- Massari, M.E. and Murre, C. (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, **20**, 429-440.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C. and Alberga, A. (1993) Definition of the DNA-binding site repertoire for the Drosophila transcription factor SNAIL. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3951-3957.
- McGill, G.G., Haq, R., Nishimura, E.K. and Fisher, D.E. (2006) c-Met expression is regulated by Mitf in the melanocyte lineage. *J Biol Chem*, **281**, 10365-10373.
- McGill, G.G., Horstmann, M., Widlund, H.R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E.K., Lin, Y.L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.F., Jordan, S.A., Jackson, I.J., Korsmeyer, S.J., Golub, T.R. and Fisher, D.E. (2002) Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*, **109**, 707-718.
- Melchior, F. (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 591-626.

- Miller, A.J., Du, J., Rowan, S., Hershey, C.L., Widlund, H.R. and Fisher, D.E. (2004) Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res*, **64**, 509-516.
- Miller, A.J., Levy, C., Davis, I.J., Razin, E. and Fisher, D.E. (2005) Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFEB. *J Biol Chem*, **280**, 146-155.
- Miller, A.J. and Mihm, M.C., Jr. (2006) Melanoma. *N Engl J Med*, **355**, 51-65.
- Molina, D.M., Grewal, S. and Bardwell, L. (2005) Characterization of an ERK-binding domain in microphthalmia-associated transcription factor and differential inhibition of ERK2-mediated substrate phosphorylation. *J Biol Chem*, **280**, 42051-42060.
- Moore, K.J. (1995) Insight into the microphthalmia gene. *Trends Genet*, **11**, 442-448.
- Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrio, D., Peinado, H., Rodriguez-Pinilla, S.M., Villa, S., Bolos, V., Jorda, M., Fabra, A., Portillo, F., Palacios, J. and Cano, A. (2006) Genetic profiling of epithelial cells expressing e-cadherin repressors reveals a distinct role for snail, slug, and e47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, **66**, 9543-9556.
- Motychkova, G., Weilbaecher, K.N., Horstmann, M., Rieman, D.J., Fisher, D.Z. and Fisher, D.E. (2001) Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5798-5803.
- Murakami, H. and Arnheiter, H. (2005) Sumoylation modulates transcriptional activity of MITF in a promoter-specific manner. *Pigment Cell Res*, **18**, 265-277.
- Murakami, M., Iwata, Y. and Funaba, M. (2007) Expression and transcriptional activity of alternative splice variants of Mitf exon 6. *Mol Cell Biochem*. (doi: 17457519).
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B. and et al. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*, **58**, 537-544.
- Nakayama, A., Nguyen, M.T., Chen, C.C., Opdecamp, K., Hodgkinson, C.A. and Arnheiter, H. (1998a) Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mech Dev*, **70**, 155-166.
- Nakayama, H., Scott, I.C. and Cross, J.C. (1998b) The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. *Dev Biol*, **199**, 150-163.
- Nechushtan, H., Zhang, Z. and Razin, E. (1997) Microphthalmia (mi) in murine mast cells: regulation of its stimuli-mediated expression on the translational level. *Blood*, **89**, 2999-3008.
- Nelson, W.J. and Nusse, R. (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*, **303**, 1483-1487.
- Nieto, M.A. (2002) The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 155-166.
- Nollet, F., Kools, P. and van Roy, F. (2000) Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*, **299**, 551-572.



- Oboki, K., Morii, E., Kataoka, T.R., Jippo, T. and Kitamura, Y. (2002) Isoforms of mi transcription factor preferentially expressed in cultured mast cells of mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**, 1250-1254.
- Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M.T., Hodgkinson, C.A., Pavan, W.J. and Arnheiter, H. (1997) Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development*, **124**, 2377-2386.
- Ozawa, M., Baribault, H. and Kemler, R. (1989) The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *Embo J*, **8**, 1711-1717.
- Partington, G.A., Fuller, K., Chambers, T.J. and Pondel, M. (2004) Mitf-PU.1 interactions with the tartrate-resistant acid phosphatase gene promoter during osteoclast differentiation. *Bone*, **34**, 237-245.
- Peinado, H., Portillo, F. and Cano, A. (2004a) Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*, **48**, 365-375.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M. and Cano, A. (2004b) Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol*, **24**, 306-319.
- Peinado, H. and Cano, A. (2005) Regulation of the E-cadherin Cell-Cell Adhesion Gene. In "DNA methylation, epigenetics and metastasis". (ed. Esteller, M) (Springer, The Netherlands), 157-190 (2005).
- Peinado, H., Olmeda, D. and Cano, A. (2007) Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, **7**, 415-428.
- Perez-Losada, J., Sanchez-Martin, M., Rodriguez-Garcia, A., Sanchez, M.L., Orfao, A., Flores, T. and Sanchez-Garcia, I. (2002) Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood*, **100**, 1274-1286.
- Perez-Moreno, M. and Fuchs, E. (2006) Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell*, **11**, 601-612.
- Perez-Moreno, M.A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M.A. and Cano, A. (2001) A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *J Biol Chem*, **276**, 27424-27431.
- Pertz, O., Bozic, D., Koch, A.W., Fauser, C., Brancaccio, A. and Engel, J. (1999) A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J*, **18**, 1738-1747.
- Postigo, A.A., Depp, J.L., Taylor, J.J. and Kroll, K.L. (2003) Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *Embo J*, **22**, 2453-2462.
- Potterf, S.B., Furumura, M., Dunn, K.J., Arnheiter, H. and Pavan, W.J. (2000) Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum Genet*, **107**, 1-6.
- Price, E.R., Ding, H.F., Badalian, T., Bhattacharya, S., Takemoto, C., Yao, T.P., Hemesath, T.J. and Fisher, D.E. (1998a) Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J Biol Chem*, **273**, 17983-17986.

- Price, E.R. and Fisher, D.E. (2001) Sensorineural deafness and pigmentation genes: melanocytes and the Mitf transcriptional network. *Neuron*, **30**, 15-18.
- Price, E.R., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Weilbaecher, K.N., Takemoto, C.M., Landis, M.W. and Fisher, D.E. (1998b) alpha-Melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome. *J Biol Chem*, **273**, 33042-33047.
- Prince, S., Carreira, S., Vance, K.W., Abrahams, A. and Goding, C.R. (2004) Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res*, **64**, 1669-1674.
- Razin, E., Zhang, Z.C., Nechushtan, H., Frenkel, S., Lee, Y.N., Arudchandran, R. and Rivera, J. (1999) Suppression of microphthalmia transcriptional activity by its association with protein kinase C-interacting protein 1 in mast cells. *J Biol Chem*, **274**, 34272-34276.
- Rimm, D.L., Koslov, E.R., Kebriaei, P., Cianci, C.D. and Morrow, J.S. (1995) Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8813-8817.
- Rodrigo, I., Cato, A.C. and Cano, A. (1999) Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp Cell Res*, **248**, 358-371.
- Saito, H., Yasumoto, K., Takeda, K., Takahashi, K., Fukuzaki, A., Orikasa, S. and Shibahara, S. (2002) Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1. *J Biol Chem*, **277**, 28787-28794.
- Salti, G.I., Manougian, T., Farolan, M., Shilkaitis, A., Majumdar, D. and Das Gupta, T.K. (2000) Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res*, **60**, 5012-5016.
- Sanchez-Martin, M., Rodriguez-Garcia, A., Perez-Losada, J., Sagrera, A., Read, A.P. and Sanchez-Garcia, I. (2002) SLUG (SNAI2) deletions in patients with Waardenburg disease. *Hum Mol Genet*, **11**, 3231-3236.
- Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T. and Goding, C.R. (1997) CBP/p300 as a co-factor for the Microphthalmia transcription factor. *Oncogene*, **14**, 3083-3092.
- Savagner, P. (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays*, **23**, 912-923.
- Seeler, J.S. and Dejean, A. (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 690-699.
- Selzer, E., Schlagbauer-Wadl, H., Okamoto, I., Pehamberger, H., Potter, R. and Jansen, B. (1998) Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res*, **8**, 197-203.
- Selzer, E., Wacheck, V., Lucas, T., Heere-Ress, E., Wu, M., Weilbaecher, K.N., Schlegel, W., Valent, P., Wrba, F., Pehamberger, H., Fisher, D. and Jansen, B. (2002) The melanocyte-specific isoform of the microphthalmia transcription factor affects the phenotype of human melanoma. *Cancer Res*, **62**, 2098-2103.

- Semb, H. and Christofori, G. (1998) The tumor-suppressor function of E-cadherin. *Am J Hum Genet*, **63**, 1588-1593.
- Shi, Y., Sawada, J., Sui, G., Affar el, B., Whetstone, J.R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M.P. and Nakatani, Y. (2003) Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, **422**, 735-738.
- Shibahara, S., Takeda, K., Yasumoto, K., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H. and Takahashi, K. (2001) Microphthalmia-associated transcription factor (MITF): multiplicity in structure, function, and regulation. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **6**, 99-104.
- Shibahara, S., Yasumoto, K., Amae, S., Fuse, N., Udono, T. and Takahashi, K. (1999) Implications of isoform multiplicity of microphthalmia-associated transcription factor in the pathogenesis of auditory-pigmentary syndromes. *J Invest Dermatol Symp Proc*, **4**, 101-104.
- Shimoyama, Y., Nagafuchi, A., Fujita, S., Gotoh, M.T., M., Tsukita, S. and Hirohashi, S. (1992) Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res.*, **52**, 5770-5774.
- Skerjanc, I.S., Truong, J., Filion, P. and McBurney, M.W. (1996) A splice variant of the ITF-2 transcript encodes a transcription factor that inhibits MyoD activity. *J Biol Chem*, **271**, 3555-3561.
- Soosaar, A., Chiaramello, A., Zuber, M.X. and Neuman, T. (1994) Expression of basic-helix-loop-helix transcription factor ME2 during brain development and in the regions of neuronal plasticity in the adult brain. *Brain Res Mol Brain Res*, **25**, 176-180.
- St Croix, B., Sheehan, C., Rak, J.W., Florenes, V.A., Slingerland, J.M. and Kerbel, R.S. (1998) E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *J Cell Biol*, **142**, 557-571.
- Stappert, J.a. and Kemler, R. (1994) A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. *Cell Adhes Commun*, **2**, 319-327.
- Steingrimsson, E., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (2004) Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet*, **38**, 365-411.
- Steingrimsson, E., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (2005) Melanocyte stem cell maintenance and hair graying. *Cell*, **121**, 9-12.
- Steingrimsson, E., Moore, K.J., Lamoreux, M.L., Ferre-D'Amare, A.R., Burley, S.K., Zimring, D.C., Skow, L.C., Hodgkinson, C.A., Arnheiter, H., Copeland, N.G. and et al. (1994) Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat Genet*, **8**, 256-263.
- Steingrimsson, E., Tessarollo, L., Pathak, B., Hou, L., Arnheiter, H., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (2002) Mitf and Tfe3, two members of the Mitf-Tfe family of bHLH-Zip transcription factors, have important but functionally redundant roles in osteoclast development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4477-4482.
- Strathdee, S. (2002) Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol.*, **12**, 373-379.
- Tachibana, M. (2000) MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res*, **13**, 230-240.
- Tagra, S., Talwar, A.K., Walia, R.L. and Sidhu, P. (2006) Waardenburg syndrome. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, **72**, 326.

- Takahashi, K. and Suzuki, K. (1996) Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Exp Cell Res*, **226**, 214-222.
- Takeda, K., Takemoto, C., Kobayashi, I., Watanabe, A., Nobukuni, Y., Fisher, D.E. and Tachibana, M. (2000a) Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Hum Mol Genet*, **9**, 125-132.
- Takeda, K., Yasumoto, K., Kawaguchi, N., Udono, T., Watanabe, K., Saito, H., Takahashi, K., Noda, M. and Shibahara, S. (2002) Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by Mitf mutations. *Biochim Biophys Acta*, **1574**, 15-23.
- Takeda, K., Yasumoto, K., Takada, R., Takada, S., Watanabe, K., Udono, T., Saito, H., Takahashi, K. and Shibahara, S. (2000b) Induction of melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor by Wnt-3a. *J Biol Chem*, **275**, 14013-14016.
- Takeichi, M. (1988a) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, **102**, 639-655.
- Takeichi, M. (1988b) Cadherins: key molecules for selective cell-cell adhesion. *IARC Sci Publ*, 76-79.
- Takeichi, M. (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*, **59**, 237-252.
- Takeichi, M. (1993) Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 806-811.
- Takeichi, M. (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 619-627.
- Takemoto, C.M., Yoon, Y.J. and Fisher, D.E. (2002) The identification and functional characterization of a novel mast cell isoform of the microphthalmia-associated transcription factor. *J Biol Chem*, **277**, 30244-30252.
- Tarin, D., Thompson, E.W. and Newgreen, D.F. (2005) The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res*, **65**, 5996-6000; discussion 6000-5991.
- Tassabehji, M., Newton, V.E. and Read, A.P. (1994) Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet*, **8**, 251-255.
- Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P. and Strachan, T. (1992) Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature*, **355**, 635-636.
- Thiery, J.P. (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, **2**, 442-454.
- Thiery, J.P. and Sleeman, J.P. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 131-142.
- Tshori, S., Sonnenblick, A., Yannay-Cohen, N., Kay, G., Nechushtan, H. and Razin, E. (2007) The Microphthalmia Transcription Factor Isoforms in Mast Cells and in the Heart. *Mol Cell Biol*.(doi: 17438132).

- Udono, T., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Watanabe, K., Saito, H., Fuse, N., Tachibana, M., Takahashi, K., Tamai, M. and Shibahara, S. (2000) Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochim Biophys Acta*, **1491**, 205-219.
- Vachtenheim, J., Novotna, H. and Ghanem, G. (2001) Transcriptional repression of the microphthalmia gene in melanoma cells correlates with the unresponsiveness of target genes to ectopic microphthalmia-associated transcription factor. *J Invest Dermatol*, **117**, 1505-1511.
- van Grunsven, L.A., Michiels, C., Van de Putte, T., Nelles, L., Wuytens, G., Verschueren, K. and Huylebroeck, D. (2003) Interaction between Smad-interacting protein-1 and the corepressor C-terminal binding protein is dispensable for transcriptional repression of E-cadherin. *J Biol Chem*, **278**, 26135-26145.
- Vance, K.W. and Goding, C.R. (2004) The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res*, **17**, 318-325.
- Verastegui, C., Bertolotto, C., Bille, K., Abbe, P., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (2000a) TFE3, a transcription factor homologous to microphthalmia, is a potential transcriptional activator of tyrosinase and TyrpI genes. *Mol Endocrinol*, **14**, 449-456.
- Verastegui, C., Bille, K., Ortonne, J.P. and Ballotti, R. (2000b) Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. *J Biol Chem*, **275**, 30757-30760.
- Verger, A., Perdomo, J. and Crossley, M. (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep*, **4**, 137-142.
- Vetrini, F., Auricchio, A., Du, J., Angeletti, B., Fisher, D.E., Ballabio, A. and Marigo, V. (2004) The microphthalmia transcription factor (Mitf) controls expression of the ocular albinism type 1 gene: link between melanin synthesis and melanosome biogenesis. *Mol Cell Biol*, **24**, 6550-6559.
- Voronova, A. and Baltimore, D. (1990) Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4722-4726.
- Watabe, M., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Takeichi, M. (1994) Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol.*, **127**, 247-256.
- Watada, H., Kajimoto, Y., Umayahara, Y., Matsuoka, T., Morishima, T., Yamasaki, Y., Kawamori, R. and Kamada, T. (1995) Ubiquitous, but variable, expression of two alternatively spliced mRNAs encoding mouse homologues of transcription factors E47 and E12. *Gene*, **153**, 255-259.
- Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B. and Tachibana, M. (1998) Epistatic relationship between Waardenburg syndrome genes MITF and PAX3. *Nat Genet*, **18**, 283-286.
- Weilbaeher, K.N., Motyckova, G., Huber, W.E., Takemoto, C.M., Hemesath, T.J., Xu, Y., Hershey, C.L., Dowland, N.R., Wells, A.G. and Fisher, D.E. (2001) Linkage of M-CSF signaling to Mitf, TFE3, and the osteoclast defect in Mitf(mi/mi) mice. *Mol Cell*, **8**, 749-758.
- Wellbrock, C. and Marais, R. (2005) Elevated expression of MITF counteracts B-Raf-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol*, **170**, 703-708.

- Widlund, H.R. and Fisher, D.E. (2003) Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*, **22**, 3035-3041.
- Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Price, E.R., Cui, J., Lessnick, S.L., Wu, M., He, X. and Fisher, D.E. (2002) Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol*, **158**, 1079-1087.
- Wong, A.a. and Gumbiner, B. (2003) Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin. *J Cell Biol*, **161**, 1191-1203.
- Wu, M., Hemesath, T.J., Takemoto, C.M., Horstmann, M.A., Wells, A.G., Price, E.R., Fisher, D.Z. and Fisher, D.E. (2000) c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev*, **14**, 301-312.
- Xu, W., Gong, L., Haddad, M.M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E.T. and Medrano, E.E. (2000) Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res*, **255**, 135-143.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. and Weinberg, R.A. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, **117**, 927-939.
- Yap, A.S.a. and Kovacs, E.M. (2003) Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol*, **160**, 11-16.
- Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K. and Shibahara, S. (2002) Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *Embo J*, **21**, 2703-2714.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y. and Shibahara, S. (1994) Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol*, **14**, 8058-8070.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y. and Shibahara, S. (1995) Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol*, **15**, 1833.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Takahashi, K., Tomita, Y. and Shibahara, S. (1997) Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem*, **272**, 503-509.
- Zhai, Y., Wu, R., Schwartz, D.R., Darrah, D., Reed, H., Kolligs, F.T., Nieman, M.T., Fearon, E.R. and Cho, K.R. (2002) Role of beta-catenin/T-cell factor-regulated genes in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Am J Pathol*, **160**, 1229-1238.
- Zhuang, L., Lee, C.S., Scolyer, R.A., McCarthy, S.W., Zhang, X.D., Thompson, J.F. and Hersey, P. (2007) Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod Pathol*, **20**, 416-426.

*ANEXO*





En este apartado se adjunta un resumen de una publicación científica, en la cual la doctorando ha participado durante el periodo predoctoral y en la que aparecen algunos resultados mostrados en la tesis:

Cancer Res. 2006 Oct 1;66(19):9543-56

**Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in Epithelial-Mesenchymal Transition.**

Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrió D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, Villa S, Bolós V, Jordá M, Fabra A, Portillo F, Palacios J, Cano A.

The transcription factors Snail, Slug, and bHLH E47 have been recently described as direct repressors of E-cadherin and inducers of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion when overexpressed in epithelial cells. Although a role of those factors in tumor progression and invasion has been proposed, whether the different repressors play distinct or redundant roles in the tumorigenic process has not been established. To further investigate this important issue, we have analyzed the gene expression profiling of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells expressing the different repressors (MDCK-Snail, MDCK-Slug, and MDCK-E47 cells) versus control MDCK cells by cDNA microarrays. A total of 243 clones (228 genes and 15 expressed sequence tags) were found to be differentially expressed between either of the three MDCK-derived cell lines and control MDCK cells. Twenty two of the candidate genes were validated by Northern blot, Western blot, immunofluorescence, and promoter analyses in cell lines and by immunohistochemistry in xenografted tumors. Gene clustering analysis indicated that about a third of the 243 candidate genes were common to MDCK cells expressing Snail, Slug, or E47 factors, whereas the rest of the genes were regulated in only one or two cell types. Differentially regulated genes include those related to EMT (45 genes), transcriptional regulation (18 genes), cell proliferation and signaling (54 genes), apoptosis (12 genes), and angiogenesis (9 genes). These results indicate that Snail, Slug, and E47 transcription factors induce common and specific genetic programs, supporting a differential role of the factors in tumor progression and invasion. (Cancer Res 2006; 66(19): 9543-56).





